

Entwicklung zellulärer Testsysteme zur Suche nach neuen Wirkstoffen gegen die Alzheimer-Krankheit

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)



seit 1558

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Biologe Kai-Uwe Schmidtke
geboren am 20. Mai 1978 in Gera

Jena

August 2010

Gutachter

1. Prof. Dr. Thomas Winckler
2. Prof. Dr. Jörg Heilmann (Universität Regensburg)
3. Prof. Dr. Dieter Steinhilber (Universität Frankfurt am Main)

Tag der öffentlichen Verteidigung: 26. November 2010

MEINER FAMILIE

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	1
2.	Einleitung.....	3
2.1.	Alzheimer-Demenz.....	3
2.1.1.	Einteilung der verschiedenen Demenzformen	3
2.1.2.	Hypothesen zur Pathogenese der Alzheimerschen Krankheit.....	4
2.1.3.	Risikofaktoren.....	9
2.1.4.	Therapiekonzepte zur Behandlung der Alzheimer-Demenz	11
2.1.5.	Neue Therapieansätze zur Behandlung der Alzheimer-Demenz	15
2.2.	Apolipoprotein E	19
2.2.1.	Struktur und Funktion von Apolipoprotein E	20
2.2.2.	Hauptisoformen von Apolipoprotein E	20
2.2.3.	Die Rolle von ApoE bei der Pathogenese der Alzheimer-Demenz.....	23
2.3.	Der N-Methyl-D-Aspartat-Ionenkanalrezeptor	25
2.3.1.	Rezeptoraufbau	25
2.3.2.	Wichtige Bindungsstellen am NMDA-Rezeptor	26
2.3.3.	Glutamat-vermittelte Exzitotoxizität.....	30
2.4.	<i>Pipturus argenteus</i> WEDD.....	31
2.5.	Zielsetzung.....	33
3.	Material und Methoden	34
3.1.	Material	34
3.1.1.	Laborgeräte	34
3.1.2.	Verbrauchsmaterialien	35
3.1.3.	Stationäre Phasen	35
3.1.4.	Chemikalien und Pufferlösungen	35
3.1.5.	Verwendete Enzyme und Reaktions-Kits	38
3.1.6.	Verwendete Lösungsmittel und Gase	38
3.1.7.	Medienzusammensetzung für Mikroorganismen	38
3.1.8.	Medienzusammensetzung für Zellkultur	39
3.1.9.	Verwendete Primer	39
3.1.10.	Verwendete Vektoren	40
3.1.11.	Hergestellte Vektorkonstrukte mit Insert	40
3.1.12.	Verwendete Antikörper.....	41
3.1.13.	Verwendete Expressions- und Klonierungsstämme sowie Phagen	42
3.1.14.	Verwendete Zelllinien	43

3.1.15.	Drogenmaterial, Extrakte und Testsubstanzen	44
3.2.	Methoden	49
3.2.1.	Zellkultur	49
3.2.2.	Molekularbiologische Methoden	50
3.2.3.	Proteinbiochemische Methoden	55
3.2.4.	Zellassays	57
3.2.4.1.	NMDA-Rezeptor-Assay (Glutamat-vermittelte Exzitotoxizität)	57
3.2.4.2.	Zellviabilitätsassay (MTT-Assay)	60
3.2.4.3.	ApoE-Peptid-vermittelte Toxizität (ApoE-Assay)	62
3.2.4.4.	Kompetitionsversuche mit Spermin	62
3.2.4.5.	PCP- und NR2B-spezifischer Bindungs-Assay (Kompetitionsbindungsstudien)	63
3.2.5.	Phytochemische Methoden	63
4.	Ergebnisse	68
4.1.	Apolipoprotein E – Assay	68
4.1.1.	Heterologe Expression von Apolipoprotein E als GST-Fusionsprotein	68
4.1.2.	Reinigungsversuche	72
4.1.3.	Solubilisierungsversuche	76
4.1.4.	Apolipoprotein-E-Peptid-induzierte Toxizität (ApoE-Peptid-Assay)	77
4.2.	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor-vermittelte Exzitotoxizität (NMDA-Assay)	80
4.2.1.	Aufbau, Charakterisierung und Validierung des Testsystems	81
4.2.2.	Screening nach inhibitorischer Aktivität am NMDA-Rezeptor	88
4.2.2.1.	Reinsubstanzen	88
4.2.2.2.	TCM-Extrakte	109
4.2.2.3.	Pflanzenextrakte der Vanuatu-Wildsammlung	112
4.2.2.4.	Aktivitätsgeleitete und präparative Trennung des <i>P. argenteus</i> -Extraktes	115
4.3.	ITS-Sequenzanalyse von <i>Pipturus argenteus</i>	121
5.	Diskussion	123
5.1.	Etablierung eines ApoE-Peptid-Assay zur Identifizierung neuroprotektiver Verbindungen	123
5.1.1.	ApoE als therapeutisches Target zur Behandlung der Alzheimer-Demenz	127
5.2.	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor-vermittelte Exzitotoxizität	129
5.2.1.	Charakterisierung und Validierung des NMDA-Assays	130
5.2.2.	Screening nach inhibitorischer Aktivität am NMDA-Rezeptor	131
5.2.2.1.	β -Carbolin-Derivate	131
5.2.2.2.	Flurbiprofen-Derivate als potentielle Alzheimer-Therapeutika	138

5.2.2.3.	Phencyclidin-Derivate.....	139
5.2.2.4.	3-Benzazepin-Derivate	140
5.2.2.5.	Andere Reinsubstanzen.....	141
5.2.2.6.	Untersuchungen von Pflanzen-Extrakten zur Auffindung von biologisch aktiven Naturstoffen und ihrer pharmakologischen Aktivität am NMDA-Rezeptor	142
5.2.3.	Der NMDA-Rezeptor als Target zur Behandlung der Alzheimer-Demenz	146
5.3.	ITS-Sequenzanalyse von <i>Pipturus argenteus</i> zur Identitätsprüfung	147
6.	Summary.....	149
7.	Abkürzungen.....	151
8.	Literaturverzeichnis	153
9.	Abbildungsverzeichnis.....	165
10.	Anhang.....	167
	Liste der wissenschaftlichen Publikationen	179
	Ehrenwörtliche Erklärung.....	180
	Danksagung	181

1. Zusammenfassung

Die Alzheimersche Krankheit (Alzheimer-Demenz, AD) ist eine weitverbreitete neurodegenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), die auf verschiedene Ursachen zurückzuführen ist. Genetische Polymorphismen des *APOE*-Gens sind als gesicherte Risikofaktoren für das Auftreten der sporadischen Alzheimer-Demenz bekannt. Für die ApoE-Familie bestehen Isoform-abhängige Unterschiede in der Proteinstabilität. Apolipoprotein E4 bildet aufgrund seiner veränderten Konformation in höherem Maße neurotoxische Fragmente als ApoE2 und ApoE3. Vor diesem Hintergrund bietet das Apolipoprotein E einen neuen möglichen Angriffspunkt zur Behandlung einer Alzheimer-Demenz. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten experimentellen Untersuchungen konnte für das synthetisch hergestellte ApoE-Tandem-Peptid ApoE(141-155)² eine signifikante toxische Wirkung an SH-SY5Y-Neuroblastom-Zellen gezeigt werden. Des Weiteren konnte *in vitro* in einem ApoE-Peptid-Bioassay für zwei aus den Pflanzen *Cynomorium songaricum* und *Pipturus argenteus* hergestellte methanolische Extrakte und eine Fraktion aus einer aktivitätsgeleiteten Fraktionierung protektive Effekte gegenüber induzierter ApoE-Peptid-Toxizität beobachtet werden.

Ein weiterer möglicher Therapieansatz zur Behandlung der Alzheimer-Demenz ist der Einsatz von *N*-Methyl-D-Aspartat-(NMDA)-Rezeptor-Antagonisten. Der therapeutische Nutzen von NMDA-Rezeptor-Antagonisten, wie dem bereits im Handel befindlichen Memantins, beruht auf der Reduktion Glutamat-induzierter Exzitotoxizität im ZNS. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein kolorimetrischer *In-Vitro*-Assay zur Suche nach potentiellen NMDA-Rezeptor-Antagonisten genutzt. Dieser Assay verwendet zwei transgene murine Fibroblasten-Zelllinien, die zwei verschiedene Rezeptor-Varianten mit den Untereinheiten NR1-1a/NR2A (L12-G10) und NR1-1a/NR2B (L13-E6) exprimieren. Durch Zugabe von L-Glutamat und Glycin wird der Ionenkanal-Rezeptor überaktiviert und die Zelle aufgrund eines dadurch erhöhten Ca^{2+} -Einstroms geschädigt (Glutamat-induzierte Exzitotoxizität).

Insgesamt wurden 105 Reinsubstanzen und 85 Extrakte aus 29 Pflanzen auf ihre antagonistische Aktivität am NMDA-Rezeptor getestet. Unter anderem wiesen neuartige N-2- und N-9-verknüpfte, quartäre, homobivalente β -Carboline hohe inhibitorische Aktivität am NMDA-Rezeptor auf, die mit der Modellsubstanz Memantin vergleichbar sind. Dagegen waren nicht-quartäre, aromatische, bivalente β -Carboline nur gering oder gar nicht aktiv.

Auch der Austausch der aromatischen β -Carbolin-Struktur gegen Pyridin-Ringe führte zu Aktivitätsverlusten. Ebenso wurden bei den getesteten monovalenten β -Carbolinen nur schwache bis fehlende Aktivitäten am NMDA-Rezeptor gemessen. Des Weiteren konnten für Phencyclidin-Derivate, ein Flurbiprofen-Derivat, ein 1,3-Diarylpyrazol-Derivat, Tacrin und dessen Derivaten eine Reduzierung der Glutamat-induzierten Exzitotoxizität beobachtet werden. Darüber hinaus konnte eine NR2B-selektive antagonistische Wirkung von 3-Benzazepin-Derivaten nachgewiesen werden.

Von den 85 untersuchten Pflanzenextrakten verursachten acht Extrakte eine Reduzierung der Glutamat-induzierten Exzitotoxizität. Unter anderem wies der methanolische Extrakt aus *Pipturus argenteus* (2766-1.9C) eine hohe inhibitorische Aktivität am NMDA-Rezeptor bei gleichzeitig geringer allgemeiner Cytotoxizität auf. Nach einer aktivitätsgeleiteten Fraktionierung konnte als aktive Sephadex-LH-20-Fraktion ein Gemisch oligomerer Procyanidine nachgewiesen werden. In weiterführenden Arbeiten werden eine Trennung des Procyanidin-Gemisches und die Strukturaufklärung der Einzelsubstanzen angestrebt.

Aufgrund der zukünftigen demographischen Entwicklung der Bevölkerung weltweit und damit verbunden einer Zunahme von Demenzerkrankungen ergibt sich die Notwendigkeit der Entwicklung neuer potentieller Wirkstoffe an bereits bekannten Zielstrukturen, wie zum Beispiel dem NMDA-Rezeptor. Darüber hinaus ist eine weiterführende Grundlagenforschung zum besseren Verständnis der Ursachen der Alzheimer-Demenz zwingend erforderlich. Insbesondere der genetische Risikofaktor *APOE ϵ 4* ist für die sporadische Form der AD und damit verbundene ApoE-abhängige Neurotoxizität ein vielversprechender Ansatz zur Prophylaxe oder Therapie.

2. Einleitung

2.1. Alzheimer-Demenz

Aufgrund der steigenden Lebenserwartung der Bevölkerung ist mit einer Zunahme von altersbedingten Demenzerkrankungen zu rechnen. Hierbei stellt die Demenz vom Typ Morbus Alzheimer (ca. 55 %) die häufigste Form dar. Bereits im Jahre 2001 waren nach Angaben der WHO etwa 18 Millionen Menschen weltweit an einer Alzheimer-Demenz (AD) erkrankt. Bis 2025 rechnet man mit einer Verdopplung der Erkrankungszahlen auf 34 Millionen. In Deutschland leiden rund 1,1 Millionen Menschen an Demenz, davon etwa zwei Drittel an Morbus Alzheimer (Robert Koch-Institut 2009).

Mehr als 100 Jahre nach der ersten Beschreibung durch Alois Alzheimer im Jahre 1906 stellt diese schwerwiegende Erkrankung des Gehirns eine große Herausforderung an das Gesundheitssystem der Zukunft dar. Neue medikamentöse Behandlungen sind notwendig, um die Kostenexplosion durch Therapie und Pflege der Betroffenen einzudämmen.

2.1.1. Einteilung der verschiedenen Demenzformen

Als Demenz wird eine chronisch-progressive Fehlfunktion des Gehirns bezeichnet, die zu einer Verschlechterung des Gedächtnisses und anderer kognitiver Funktionen einschließlich Denkvermögen, Orientierung, Sprache, Urteilsvermögen und emotionaler Kontrolle führt. Der Verlauf der Erkrankung ist progredient und mit einer erhöhten Sterblichkeit verbunden. Man unterscheidet primäre (hirnorganische) und sekundäre (nicht-hirnorganische) Demenzformen, wobei die primären 90 % aller Demenzfälle ausmachen. Sie sind gekennzeichnet durch irreversible, neurodegenerative und vaskuläre Veränderungen des Gehirns. Zu den wichtigsten primären Demenztypen zählen Morbus Alzheimer, Demenz mit Lewy-Körperchen, vaskuläre Demenz und die frontotemporale Demenz. Durch multifaktorielle Genese sind aber auch Mischformen möglich, wobei eine Alzheimer-Demenz meist beteiligt ist. Sekundäre Demenzen werden durch andere organische Erkrankungen wie Schädelhirntraumata, Hirntumore, Infektionen oder die Einnahme neurotoxischer Verbindung (Arzneistoffe, Alkohol und Drogen) ausgelöst. Im Unterschied zu primären Demenzen treten sie reversibel auf.

Bei der Alzheimer-Demenz unterscheidet man die rein genetisch bedingte familiäre Form und die sporadische Form. Die meisten Alzheimer-Patienten (ca. 90 % aller Fälle) leiden an der sporadischen Form, die in der Regel ohne familiären Hintergrund und erst im hohen

Alter (> 65 Jahre) auftritt. Sie wird deshalb auch als *late-onset* AD bezeichnet. Die Gruppe der an sporadischer AD erkrankten Patienten scheint hinsichtlich des Ausmaßes der Beteiligung unterschiedlicher Faktoren sehr heterogen zusammengesetzt zu sein (Richartz-Salzbürger 2007). Der Beginn der ersten Krankheitssymptome der auch als *early-onset* AD bezeichneten familiären Form setzt typischerweise vor dem 65., mitunter bereits zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr ein (Weyerer 2005).

Beide AD-Formen zeigen ein ähnliches klinisches Endbild mit gleichen pathologischen Veränderungen des Gehirns. Man spricht auch von einer überlappenden Pathogenese mit gemeinsamer Endstrecke. Unterschiede zeigen sich jedoch bei Krankheitsverlauf, Erkrankungsalter und dem Voranschreiten der Symptome. Jüngere Patienten zeigen durch den schnelleren Verlauf der Krankheit ein ausgeprägteres pathologisches Krankheitsbild (Brouwers *et al.* 2008).

2.1.2. Hypothesen zur Pathogenese der Alzheimerschen Krankheit

Die Ursachen der Pathogenese von Morbus Alzheimer sind nach wie vor nicht eindeutig geklärt und werden daher aktuell noch immer intensiv erforscht. Nach heutigem Kenntnisstand spielen sowohl genetische als auch exogene, umweltbedingte Faktoren eine Rolle. Man spricht auch von einer multifaktoriellen Erkrankung.

Histopathologische Veränderung im Gehirn von AD-Patienten

Bereits Alois Alzheimer entdeckte bei der mikroskopischen Untersuchung von Hirnschnitten charakteristische morphologische Veränderungen des Gehirns. Diese Veränderungen stellten sich als extrazelluläre Proteinablagerung (senile Plaques) und als intrazelluläre Filamente (neurofibrilläre Bündel) dar.

Aus dem Verlust von Nervenzellen infolge fortschreitender Schädigung des neuronalen Cytoskelettes durch diese Ablagerungen resultiert ein allmählicher Verlust der Hirnsubstanz (kortikale Atrophie des Hirns). Mit Hilfe bildgebender Verfahren (MRT, CT) lassen sich diese Veränderungen und deren Verlauf darstellen. Eine gesicherte Diagnose lässt sich abschließend jedoch nur durch eine histopathologische Untersuchung des Gehirns *post mortem* bestätigen.

Amyloid-Kaskade-Hypothese

Bei allen Formen der Alzheimerschen Krankheit kommt es zu einer pathologischen Akkumulation von β -Amyloid-Protein in Form extrazellulär abgelagerter seniler Plaques. Diese bestehen im Wesentlichen aus dem ca. 4 kDa großen fibrillären β -Amyloid-Peptid ($A\beta$). Das Peptid besteht aus 39-42 Aminosäuren und liegt in einer β -Faltblattstruktur vor. Es entsteht durch proteolytische Spaltung des Amyloid-Precursor-Proteins (APP) mit Hilfe von β - und γ -Sekretasen. APP ist ein ubiquitär vorkommendes integrales Typ-I-Membranprotein (753-770 Aminosäuren) mit einer großen extrazellulären Domäne und einem kurzen cytoplasmatischen Anteil. Es liegt im Gehirn in mehreren Isoformen vor (APP_{695} , APP_{751} , APP_{770}), wobei APP_{695} ausschließlich in Neuronen gebildet wird (Mills und Reiner 1999). Das APP und seine physiologischen, durch α -Sekretasen entstandenen proteolytischen Fragmente (nicht-amyloidogene Spaltung), dienen dem Erhalt der Nervenzellfunktion (Haass und Selkoe 2007, Young-Pearse *et al.* 2008). Allerdings kann APP alternativ durch β - und γ -Sekretasen gespalten werden (amyloidogene Spaltung). Dabei entstehen $A\beta$ -Peptide, die in ihrer Länge variieren. Etwa 90 % der gebildeten Peptide bestehen aus 40 ($A\beta_{40}$), ein kleinerer Teil jedoch aus 42 Aminosäuren ($A\beta_{42}$) (Zimmermann 2005). Für die Pathogenese scheint das Verhältnis zwischen $A\beta_{42}$ und $A\beta_{40}$ eine entscheidende Rolle zu spielen. Das unlösliche $A\beta_{42}$ neigt aufgrund seiner hydrophoberen Eigenschaften stärker zur Aggregation als $A\beta_{40}$ und kann die Aggregation von $A\beta_{40}$ sogar beschleunigen. Die daraus entstehenden Oligomere und Amyloidfibrillen sind möglicherweise für die neurotoxische Wirkung verantwortlich. Deshalb ist $A\beta_{42}$ Hauptbestandteil der extrazellulären senilen Plaques. Mutationen im APP-Gen sowie in den Präsenilin-Genen führen zu einer erhöhten Gesamtmenge an $A\beta$ und einer gesteigerten Bildung von $A\beta_{42}$ -Peptiden (Haass und Selkoe 2007).

Die extrazelluläre Ablagerung von $A\beta$ -Peptiden stellt jedoch noch keine hinreichende Ursache für die Entstehung einer Alzheimer-Demenz dar. Ausgehend von der Akkumulation von $A\beta$ -Peptiden wird die Auslösung einer Kaskade angenommen, die letztendlich zu neuronaler Dysfunktion und kognitivem Abbau führt. Die Amyloid-Kaskade-Hypothese wurde zunächst für die familiäre Alzheimer-Demenz beschrieben (Hardy 1992). Sie gilt mittlerweile auch als wichtiger Bestandteil der multifaktoriellen Genese der sporadischen Form. Die erhöhte Bildung von $A\beta$ -Peptiden führt zu einer gesteigerten Amyloid-Ablagerung in Form von Plaques, zu sekundären Entzündungsprozessen und zu einer abnormalen

Oligomerisierung sowie zu einer Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins. Eine Veränderung des A β -Levels kann durch einen Anstieg der Total-A β -Produktion, durch eine veränderte A β -Clearance (Abbau und Abtransport) oder durch Veränderung des A β_{42} /A β_{40} -Verhältnisses zu Gunsten von A β_{42} erfolgen (Haass und Selkoe 2007).

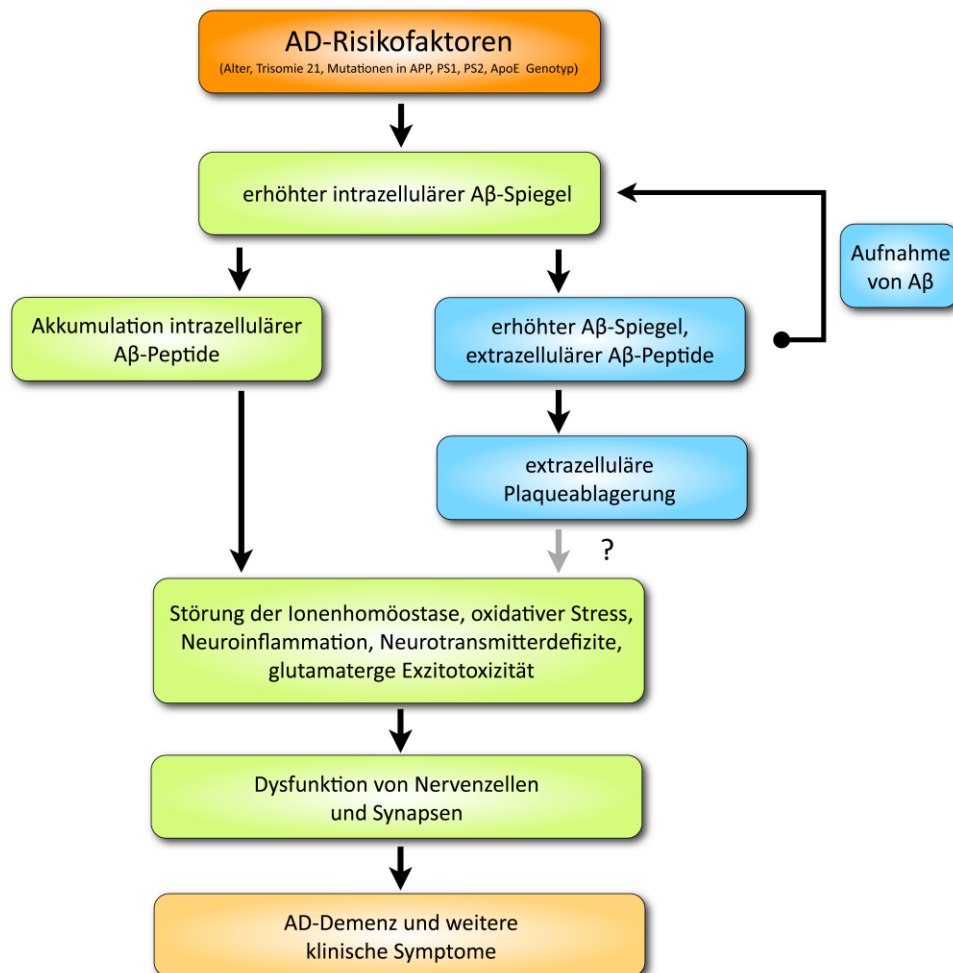


Abbildung 1 | Modifizierte Amyloid-Kaskaden-Hypothese (modifiziert nach Wirths *et al.* 2004)

Die klassische Amyloid-Hypothese geht von einer fortschreitenden extrazellulären Ablagerung von A β aus, die letztendlich mit allen sekundären Prozessen zu einer Dysfunktion von Nervenzellen und Synapsen führt. Aufgrund neuerer Untersuchungen in verschiedenen Mausmodellen und histopathologischen Untersuchungen von AD-Patienten wird eine modifizierte Amyloid-Kaskaden-Hypothese von Wirths *et al.* (2004) vorgeschlagen. In dieser ist die Akkumulation intrazellulärer A β -Peptide von zentraler Bedeutung und eigentlicher Auslöser pathologischer Veränderung im Gehirn.

Die Theorie der β -Amyloid-Kaskade ist in ihrer ursprünglichen Form sehr umstritten. Neuere Forschungsergebnisse deuten auf die Präsenz und die pathologische Relevanz intraneuronaler A β -Akkumulationen hin (Wirths *et al.* 2004). In einem Mausmodell wurde gezeigt, dass der Bildung von intraneuronalem A β der Plaquebildung vorausgeht (Wirths *et al.* 2001). Außerdem korreliert nur die intrazelluläre A β -Aggregation mit dem Verlust von

Nervenzellen (Casas *et al.* 2004). Abbildung 1 gibt einen Überblick über die modifizierte Amyloid-Kaskaden-Hypothese.

Neuere Untersuchungen zeigen, dass N-terminal modifizierte $A\beta_{42}$ -Peptide bei den pathologischen Veränderungen eine wichtige Rolle spielen können (Geddes *et al.* 1999). Bei 60 % aller vorkommenden $A\beta$ -Peptide handelt es sich um diese am N-Terminus derivatisierten Verbindungen (Sergeant *et al.* 2003). Casas *et al.* konnten in transgenen Mäusen intrazelluläre $A\beta$ -Peptide nachweisen, die entweder mit der D- und L-Form von Aspartat an Position 1 oder mit einem Pyro-Glutamat an Position 3 ($A\beta_{3(pE)-42}$) beginnen. Durch die Bildung des Pyro-Glutamats (Abbildung 2) werden die Peptide stabilisiert und vor enzymatischer Degradation geschützt (Sergeant *et al.* 2003). $A\beta_{3(pE)-42}$ -Peptide bilden schneller eine β -Faltblattstruktur aus, neigen stärker zur Aggregation und sind neurotoxischer als „normale“ $A\beta_{42}$ -Peptide. Die häufigste $A\beta$ -Form im Gehirn von Alzheimer- und Down-Syndrom-Patienten sind Pyro-Glutamat-Peptide (Russo *et al.* 1997, Gyure *et al.* 2001, Wirths *et al.* 2009). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der hohe Nervenzellverlust, die Hirnatrophie und die synaptischen Dysfunktionen eher aufgrund der intraneuronalen Amyloid-Pathologie entstehen und nicht als Folge der extrazellulären senilen Plaques zu sehen ist. Diese Schlussfolgerung stellt das therapeutische Konzept der extrazellulären Plaque-Reduzierung bzw. der Immunisierung gegen Plaques in Frage.

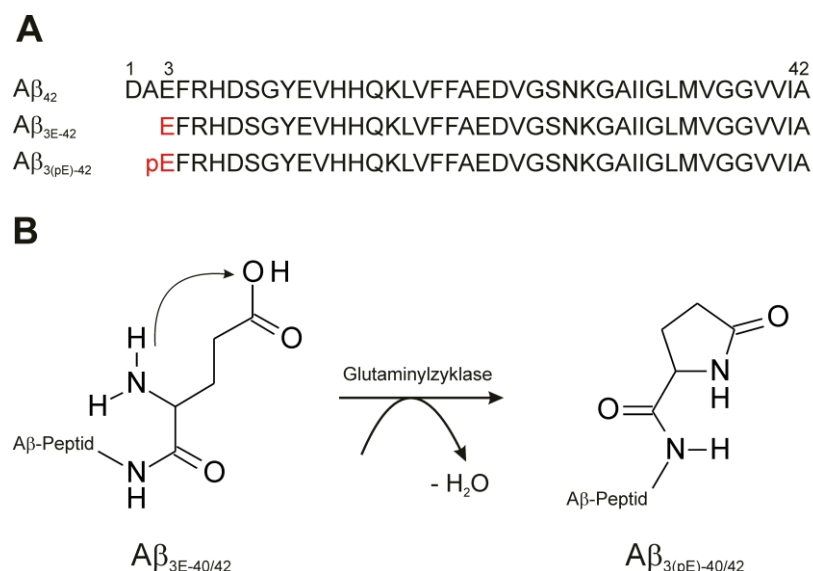


Abbildung 2 | Bildung von Pyro-Glutamat- $A\beta$ -Peptid (modifiziert nach Wirths *et al.* 2009)

(A) Aminosäure-Sequenz von $A\beta_{42}$ mit Aspartat (D) an Position 1, $A\beta_{3E-42}$ mit Glutamat (E) an Position 1 und $A\beta_{3(pE)-42}$ mit Pyro-Glutamat (pE) an Position 1. (B) Das Enzym Glutaminylcyclase katalysiert die Reaktion von N-terminalem Glutamat zu zyklisiertem Pyroglutamat. Dabei bildet sich unter Wasserabspaltung durch Ringschluss ein Lactam.

Neurofibrilläre Bündel als weitere Ursache für Alzheimer-Demenz

Ein weiteres Merkmal der Alzheimerschen Krankheit sind die intrazellulären Proteinablagerungen in Form neurofibrillärer Bündel. Diese bestehen aus abnormal hyperphosphoryliertem, Mikrotubuli-assoziiertem Tau-Protein.

Im adulten menschlichen Gehirn sind sechs verschiedene Isoformen von Tau bekannt, die durch alternatives mRNA-Spleißen der Exons 2, 3 und 10 auf Chromosom 17 gebildet werden. Dabei entstehen verschieden lange Tau-Proteine mit 352 bis 441 Aminosäuren (Goedert *et al.* 1989). Tau spielt eine Schlüsselrolle für die Regulation des Cytoskeletts, des axonalen Transportes und das Neuritenwachstum. Diese Funktionen werden durch Phosphorylierungsreaktionen von verschiedenen Kinasen reguliert. Wie viele Tau-Kinasen *in vivo* beteiligt sind, ist Gegenstand aktueller Forschung. Insbesondere die Glykogen-Synthase-Kinase 3 β (GSK3 β) und Cyclin-abhängige Kinase 5 (Cdk5) werden mit der Hyperphosphorylierung von Tau in Zusammenhang gebracht und könnten potentielle therapeutische Angriffspunkte darstellen (Johnson und Stoothoff 2004, Iqbal und Grundke-Iqbal 2008).

Nach heutigem Verständnis der AD-Pathogenese führen physiologische Störungen des Zellstoffwechsels der Nervenzellen zu einer verstärkten Phosphorylierung der Tau-Proteine. Tau wurde erstmals von Weingarden *et al.* (1975) als wichtiger Faktor zum Aufbau des Cytoskeletts beschrieben. In seiner normalen Funktion bindet Tau an Mikrotubuli-Proteine und kann so den Transport von Vesikeln und Zellorganellen entlang der Mikrotubuli beeinflussen. Bei einer unphysiologisch hohen Phosphorylierungsrate des Tau-Proteins ist diese Bindung deutlich geschwächt. In der Folge kommt es zu Transportstörungen innerhalb der Zelle. Darüber hinaus aggregiert hyperphosphoryliertes Tau-Protein zu den typischen neurofibrillären Bündeln in Form von gepaarten helikalen Filamenten (*paired helical filaments, PHFs*), die in einer β -Faltblattstruktur vorliegen (Friedhoff *et al.* 2000, Inouye *et al.* 2006).

Bei verschiedenen „Tau-assoziierten Erkrankungen“ wurde eine abnormale Phosphorylierung beobachtet (Lee *et al.* 2001). Dazu gehören neben der Alzheimer-Demenz die frontotemporale Demenz, das Parkinson-Syndrom und Morbus Pick. Sie werden unter dem Oberbegriff der Tauopathien zusammengefasst (Bulic *et al.* 2009).

Für das klinische Bild der Alzheimer-Demenz scheint die Bildung der neurofibrillären Bündel notwendig zu sein (Iqbal und Grundke-Iqbal 2008). Strittig ist, ob sie krankheitsauslösend sind oder in der Folge primärer Krankheitsprozesse in Erscheinung treten.

2.1.3. Risikofaktoren

Genetische Risikofaktoren

In Zwillingsuntersuchungen und Familienstudien konnten drei Gene identifiziert werden, die bei der Pathogenese der früh beginnenden Alzheimer-Demenz eine wichtige Rolle spielen. Diese AD-Risikogene (Tabelle 1), lokalisiert auf den Chromosomen 1, 14 und 21, kodieren für das Amyloid-Precursor-Protein (APP) und für die Präsenilinproteine (PSEN). Zurzeit sind etwa 32 pathologische Mutationen im *APP*-Gen, 178 im *PSEN1*-Gen und 14 im *PSEN2*-Gen bekannt (AD & FTD Mutation Database, Bertram und Tanzi 2008).

APP war das erste mit der autosomal dominanten Form (Erkrankungsalter vor dem 65. Lebensjahr) der Alzheimer-Demenz in Verbindung gebrachte Gen. Veränderungen können direkt in der kodierenden Region erfolgen mit Auswirkung auf die Aminosäuresequenz des Proteins. Sie können aber auch den Promotor betreffen, was sich auf die Transkriptionsraten auswirken kann. Außerdem kann die Genkopienzahl erhöht sein.

Tabelle 1 | AD-Risikogene (modifiziert nach Brouwers *et al.* 2008, Bertram und Tanzi 2008)

Formen der AD	Gen/Protein [Chromosom]	Mutationen	Beeinflussung der AD-Pathogenese
<i>early-onset</i>	<i>APP</i> /Amyloid-Precursor-Protein [21q21.3]	Genprodukt, Promotor, Genkopienzahl	Anstieg der A β -Produktion und/oder des A β_{42} /A β_{40} -Verhältnisses
	<i>PSEN1</i> /Präsenilin 1 [14q24.3]	Genprodukt	Anstieg des A β_{42} /A β_{40} -Verhältnisses, enzymatische Rolle im γ -Sekretase-Komplex
	<i>PSEN2</i> /Präsenilin 2 [1q31-42]	Genprodukt	Anstieg des A β_{42} /A β_{40} -Verhältnisses, enzymatische Rolle im γ -Sekretase-Komplex
<i>late-onset</i>	<i>APOE</i> /Apolipoprotein E [19q13.2]	Genprodukt, Promotor	Beeinflussung der Dichte der senilen Plaques und der vaskulären Ablagerungen

Mutationen, die zu einer geänderten Proteinstruktur innerhalb bzw. nahe der A β -Region oder in der Nachbarschaft der Protease-Schnittstellen führen, haben einen Einfluss auf die Prozessierung des Amyloid-Precursor-Proteins und damit auch auf die Produktion von A β . Durch gesteigerte APP-Produktion erhöht sich das Risiko der A β -Ablagerung, was zu einer

Alzheimer-Demenz mit typischen Veränderungen führen kann. Man spricht auch von einem Gen-Dosis-Effekt. Mutationen, die die Kopienzahlen oder die Transkriptionsraten betreffen, weisen ähnliche Effekte auf (Brouwers *et al.* 2008).

Die Lokalisation des *APP*-Gens auf Chromosom 21 könnte auch die Häufung von Alzheimer-Demenz bei Down-Syndrom-Patienten erklären. Da bei Trisomie 21 das Chromosom oder Teile davon dreifach vorhanden sind, besitzen Down-Syndrom-Patienten drei Kopien des *APP*-Gens.

Präseniline sind als Bestandteile des katalytischen γ -Sekretase-Komplexes (De Strooper *et al.* 1998) und an der Spaltung verschiedener Typ-1-Transmembranproteine wie APP und Notch beteiligt (De Strooper *et al.* 1999). Mutationen in diesen Genen können Protein-Interaktionen innerhalb des Komplexes durch Konformationsänderung beeinflussen. Folge dieser Veränderungen wäre eine Verschiebung des $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ -Verhältnisses zu Gunsten des längeren $A\beta_{42}$ -Fragmentes, welches eine höhere Tendenz zur Aggregation aufweist (Bentahir *et al.* 2006). Die meisten pathologischen *PSEN*-Mutationen führen zu einer *early-onset* AD mit typischen histopathologischen Veränderungen (Plaques und Neurofibrillenbündel), die sich nicht von der sporadischen Form abgrenzen lässt. Lediglich Krankheitsbeginn und beschleunigter, ausgeprägter Krankheitsverlauf unterscheiden sich (Brouwers *et al.* 2008).

Für die *late-onset* AD wurde das Apolipoprotein E4-Allel (Kapitel 2.2.) als gesicherter Risikofaktor identifiziert (Bertram und Tanzi 2008). Jedoch gibt es aus Kopplungsuntersuchungen vermehrt Hinweise auf weitere mögliche Risikogene auf den Chromosomen 9, 10 und 12 (Heun und Kölsch 2003). Des Weiteren zeigten Jiang und Jia (2009) in ihren Untersuchungen einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer *late-onset* AD und einer veränderten NMDA-Rezeptor-Expression. Die Komplexität der Pathophysiologie der Alzheimerschen Erkrankung legt eine Interaktion von unterschiedlichen Genen nahe (Heun und Kölsch 2003).

Weitere nicht-genetische Risikofaktoren

Die Alzheimer-Demenz hat eine komplexe Ätiologie und Pathogenese, bei der sowohl genetische als auch nicht-genetische (exogene, umweltbedingte) Faktoren eine Rolle spielen können. Inwiefern diese Faktoren das Erkrankungsrisiko erhöhen, ist Gegenstand aktueller Forschung und Diskussion.

Als Hauptrisikofaktor zählt die steigende Lebenserwartung der Bevölkerung. Mit zunehmendem Alter nimmt das Risiko, an einer Demenz zu erkranken, überproportional zu (Weyerer 2005). Bemerkenswert dabei ist, dass in den jeweiligen Altersgruppen Frauen häufiger von Demenzen betroffen sind als Männer. Unter Berücksichtigung der höheren Lebenserwartung von Frauen gibt es aber keinen signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschied in der altersspezifischen Erkrankungshäufigkeit (Maslow 2008).

Weitere in der Fachliteratur kontrovers diskutierte Risikofaktoren sind: Typ-2-Diabetes, Bluthochdruck, inflammatorische Prozesse im Gehirn, Schädel-Hirn-Traumata, Schlaganfall, Hypercholesterinämie in Verbindung mit Übergewicht, oxidativer Stress, Umweltverschmutzung und sozial-ökonomischer Status in Verbindung mit dem Bildungsgrad (Maslow 2008). Verschiedene Untersuchungen haben sich mit dem Zusammenhang zwischen Bildung und Demenzrisiko beschäftigt. Sie kommen zu dem Ergebnis, dass ein höherer Bildungsgrad mit fortwährender intellektueller Beschäftigung im Alltag und im Berufsleben das Risiko für eine Demenzerkrankung senkt. Forscher sprechen von einer „kognitiven Reserve“, die man im Laufe des Lebens erwirbt (Stern *et al.* 1994, Keller 2006). Menschen, die eine solche Reserve aufgebaut haben, sind in der Lage, Symptome der Krankheit zu kompensieren oder zumindest hinauszuzögern (Whalley *et al.* 2004).

2.1.4. Therapiekonzepte zur Behandlung der Alzheimer-Demenz

Die medikamentöse Intervention ist ein wesentlicher Bestandteil des Gesamttherapiekonzeptes. Die derzeit verfügbaren Arzneimittel können im besten Fall 6 bis 12 Monate temporär Symptome mildern und die Progression der Krankheit verzögern (Maslow 2008). Die Behandlung orientiert sich am Krankheitsstadium und bezieht Angehörige sowie Pflegepersonal mit ein. Ziel ist es, vorhandene geistige und körperliche Aktivitäten zu erhalten und zu fördern. Nicht-medikamentöse Strategien und Behandlung mit Psychopharmaka gehören genauso dazu wie der Einsatz von Antidementiva. Unter dem Begriff Antidementiva werden Wirkstoffe zusammengefasst, die für die Therapie der Alzheimer-Demenz geprüft und zugelassen wurden. Dazu zählen die Acetylcholinesterase-Inhibitoren (AChE-Hemmer) und NMDA-Rezeptor-Antagonisten. Außerdem werden Nootropika mit vigilanzsteigernden Effekten eingesetzt. Abbildung 3 zeigt eine mögliche Pharmakotherapie in Abhängigkeit von Stadium und Schweregrad der Krankheit. Bei leichter AD-Symptomatik kommen zum Beginn Antidepressiva und AChE-Hemmer zum Einsatz. Erst

bei mittlerer bis schwerer Symptomatik wird der *N*-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor-Antagonist (NMDA-Rezeptor-Antagonist) Memantin verabreicht. Im letzten Stadium der Krankheit werden vorwiegend Neuroleptika angewendet (Schweiger 2008).

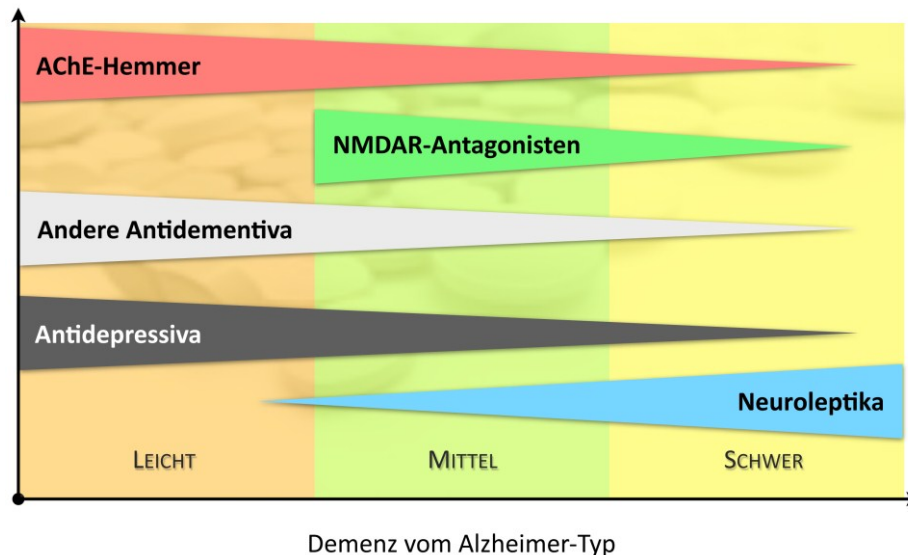


Abbildung 3 | Pharmakotherapie mit Antidementiva und Psychopharmaka (modifiziert nach Schweiger 2008)

Acetylcholinesterase-Hemmer

Bereits seit mehr als zehn Jahren werden Acetylcholinesterase-Hemmer zur Behandlung der Alzheimer-Demenz eingesetzt. Diese sehr gut untersuchte Wirkstoffgruppe gehört heutzutage zur Standardtherapie der leichten bis mittelschweren Demenz.

Cholinesterase-Inhibitoren gleichen den Acetylcholin-Mangel aus, der durch Schädigung bzw. Verminderung der Anzahl cholinergischer Neurone im Gehirn hervorgerufen wird. Sie verlangsamen den Abbau des Acetylcholins und erhöhen somit dessen Konzentration im synaptischen Spalt. Acetylcholin ist für viele kognitive Prozesse wie Lernen und Gedächtnisbildung notwendig (Darvesh *et al.* 2003a). Tacrin (Cognex®, Romotal®) war der erste zugelassene AChE-Inhibitor (Zulassung 1995). Aufgrund hepatotoxischer Nebenwirkungen wurde Tacrin durch neuere Substanzen ersetzt. In Deutschland derzeit zugelassene AChE-Inhibitoren zur Therapie der Alzheimer-Demenz sind: Galantamin (Reminyl®), Rivastigmin (Exelon®) und Donepezil (Aricept®). Sie unterscheiden sich nur in ihrer Pharmakokinetik. Für alle zugelassenen Substanzen wurde ein moderater klinischer Nutzen nachgewiesen, insbesondere für das Therapieziel „kognitive Leistungsfähigkeit“. Des Weiteren konnte ein positiver Effekt auf die Alltagskompetenz verzeichnet werden (IQWiG 2007, Schweiger 2008).

NMDA-Rezeptor-Antagonist Memantin

Memantin ist ein moderat affiner, nicht-kompetitiver NMDA-Rezeptor-Antagonist und seit 2002 in der EU zur Behandlung der mittleren bis schweren Alzheimer-Demenz zugelassen. Es ist anzunehmen, dass Memantin in das glutamaterge Neurotransmittersystem eingreift. Bei neurodegenerativen Hirnerkrankungen wie der Alzheimerschen Krankheit ist die Freisetzung und Aufnahme von L-Glutamat gestört. Dadurch befindet sich eine unphysiologisch hohe Konzentration im synaptischen Spalt. Dies führt zu einer Überstimulierung der NMDA-Rezeptoren und somit zu einem lang anhaltenden Calcium-Einstrom. In Folge der Überladung mit Ca^{2+} -Ionen werden neuronale Zellen geschädigt (Glutamat-vermittelte Exzitotoxizität siehe Kapitel 2.3.3.). Memantin soll die Überaktivierung des NMDA-Rezeptors und damit die pathologische Wirkung des Glutamatüberschusses unterbinden, ohne gleichzeitig physiologische Neurotransmitterfunktion zu unterbinden (Danysz *et al.* 2000). Ende der 1980er und Anfang der 1990er Jahre wurde erstmalig der Wirkmechanismus von NMDA-Antagonisten durch Kronhuber *et al.* (1989) und Chen *et al.* (1992) beschrieben.

Die neuroprotektiven Eigenschaften von Memantin wurden in einer Vielzahl von Zell- und Tierexperimenten untersucht und bestätigt (Lipton 2006). Die klinische Nutzenbewertung hingegen ist schwierig. Im Abschlussbericht der IQWiG von 2009 zur Wirksamkeit von Memantin bei Alzheimer-Demenz wurden „statistisch signifikante Effekte zugunsten von Memantin“ gefunden für die Therapieziele „Beeinträchtigung der Aktivitäten des täglichen Lebens“ und „kognitive Leistungsfähigkeiten“ (IQWiG 2009). Als problematisch erweist sich hierbei eine Leistungsbewertung bei Patienten mit mittelschwerer und schwerer Demenz (Schweiger 2008).

Ginkgo-Extrakt und andere Nootropika

Neben vielen pharmakologisch wirksamen Arzneistoffen gibt es eine Reihe von pflanzlichen Extrakten, die zum Teil die Hirnfunktion wie Gedächtnis und Konzentrationsfähigkeit verbessern sollen. Im Gegensatz zu den bereits erwähnten Arzneistoffklassen handelt es sich bei den Nootropika eher um Verbindungen mit unspezifischen Wirkansätzen. Ihnen werden durchblutungsfördernde, stoffwechselanregende, antioxidative und antiinflammatorische Wirkungen zugeschrieben. Problematisch gestaltet sich bei dieser Gruppe der Nachweis der Wirksamkeit.

Zu den in der Bundesrepublik Deutschland zugelassenen und positiv monographierten Nootropika gehören Nimodipin, die Mutterkornalkaloid-Derivate Dihydroergotoxin(-mesilat) und Nicergolin, Piracetam, Pyritinol sowie Ginkgo-Extrakte. Das wichtigste Medikament dieser Gruppe stellt der Extrakt aus den Blättern des Fächerbaums *Ginkgo biloba* L. dar. EGb761® und LI1370 sind die am häufigsten verwendeten standardisierten Aceton-Wasser-Extrakte aus den Blättern. Diese werden in einem mehrstufigen Extraktionsverfahren hergestellt und beinhalten pharmakologisch relevante Inhaltsstoffe wie Ginkgoflavonglykoside und Terpenlactone. Unerwünschte Begleitstoffe wie die potentiell Allergie auslösenden Ginkgolsäuren werden dabei abgereichert. Den Extrakten werden Radikalfängereigenschaften, durchblutungsfördernde und neuroprotektive Eigenschaften zugesprochen. Zu den Indikationen zählen, neben einer Behandlung von hirnorganischen Leistungsstörungen mit Gedächtnis- und Konzentrationsstörungen, auch Schwindel, Ohrensausen und Kopfschmerzen (Schweiger 2008).

Die Wirksamkeit von Ginkgo-haltigen Präparaten wird heftig und kontrovers diskutiert. Das Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen (IQWiG) kommt in einer Analyse aus dem Jahr 2008 zu dem Schluss, dass ein Nutzen von Ginkgo-Präparaten bei einer Dosierung von 240 mg/Tag für das Therapieziel „Aktivitäten des täglichen Lebens“ gegeben war. Für die Therapieziele „kognitive Fähigkeiten“ und „allgemeine psychopathologische Symptome“ gibt es bei einer Dosierung von 240 mg täglich einen Hinweis auf einen Nutzen (IQWiG 2008).

Zwei neuere amerikanische Studien aus den Jahren 2008 und 2009 zeigten jedoch keinerlei Nutzen für den Patienten im Vergleich zur Placebogruppe. Die Einnahme des Präparates erbrachte weder eine Verbesserung des geistigen Allgemeinbefindens, noch wirkte es sich auf einzelne kognitive Funktionen des Gehirns aus. Verabreicht wurde zweimal täglich 120 mg/Tag EGb761® über einen Zeitraum von 8 Jahren (DeKosky *et al.* 2008, Snitz *et al.* 2009).

2.1.5. Neue Therapieansätze zur Behandlung der Alzheimer-Demenz

Die Alzheimer-Krankheit ist auch 100 Jahre nach ihrer Entdeckung noch nicht heilbar. Die Anzahl von therapeutischen Optionen ist zum heutigen Zeitpunkt als unbefriedigend einzustufen. Da sich die Zahl von Erkrankten in den nächsten Jahrzehnten fast verdreifachen wird, ist es nötig, neue Strategien zur Behandlung zu finden. Zurzeit befinden sich zahlreiche neue Substanzen in klinischen Studien oder sind noch in der präklinischen Entwicklungsphase. In den kommenden Jahren wird sich die Alzheimertherapie ändern, dabei stehen kausale Therapiekonzepte im Vordergrund.

Inhibition der Butyrylcholinesterase

Zunehmend wird auch die Funktion und Inhibition der Butyrylcholinesterase (BChE) erforscht, da im Verlauf der Alzheimer-Erkrankung die kortikale Konzentration von AChE tendenziell abnimmt. Die BChE-Konzentration dagegen bleibt unverändert oder ist leicht erhöht (Darvesh *et al.* 2003b). Die katalytische Reaktion der Butyrylcholinesterase verläuft analog zur Acetylcholinesterase, sie unterscheiden sich lediglich in ihrer Substratspezifität. BChE hydrolysiert Butyrylcholin (BCh), kann aber auch Acetylcholin (ACh) spalten. Im Gegensatz zu AChE, das selektiv nur ACh spaltet und inaktiv gegenüber anderen größeren Estern ist (Massoulié *et al.* 1998). Es wird davon ausgegangen, dass in Abwesenheit der AChE die BChE einige Funktionen übernehmen kann. Außerdem wird ein Einfluss hoher Konzentrationen an Butyrylcholinesterase auf die Bildung von A β -Oligomeren und Neurofibrillenbündeln diskutiert (Guillozet *et al.* 1997).

Sekretaseinhibitoren und -modulatoren

Aufbauend auf den Erkenntnissen der Pathogenese der Alzheimer-Demenz liegt der kausaltherapeutische Ansatz einer Hemmung von β - und γ -Sekretasen nahe mit dem Ziel einer Verminderung des Auftretens schädlicher A β -Peptide. Der β -Sekretasehemmer CTS21166 (CoMentis) erwies sich in einer Phase-I-Studie als sicher und gut verträglich (ClinicalTrials.gov). Bereits in Phase III befindet sich der γ -Sekretaseinhibitor LY450139 (Eli Lilly). Dieser konnte in Phase-II-Studien signifikant die Produktion und Sekretion von schädlichen A β -Peptiden senken (Fleisher *et al.* 2008). Des Weiteren werden z. Z. mit GSI136 und GSI953 (Wyeth) zwei weitere γ -Sekretaseinhibitoren in Phase-I-Studien geprüft.

Das nicht-steroidale Antirheumatikum R-Flurbiprofen (Abbildung 4) gilt als γ -Sekretase-Modulator und erwies sich während der klinischen Phase-II-Studie als vielversprechend. Die

Ergebnisse konnten aber in Phase III nicht bestätigt werden, sodass die Firma Myriad die Entwicklung eingestellt hat (Geerts 2007). Ein weiterer Ansatz ist die Stimulation der α -Sekretase, um das Gleichgewicht der APP-Prozessierung auf die nicht-amyloidogene-Seite zu verschieben (Smith *et al.* 2010).

Glutaminylzyklase als neues Target

Ein neuer Therapieansatz wurde von der Firma Probiobrug AG (Halle/Saale) entwickelt. Im Mittelpunkt ihrer Forschung steht das Enzym Glutaminylzyklase (siehe auch Abbildung 2). Es wird vermutet, dass dieses Enzym eine wichtige Rolle bei Pathogenese der Alzheimerschen Krankheit spielt (Cynis *et al.* 2008). Glutaminylzyklase katalysiert die Zyklisierung von N-terminalem Glutamin oder Glutamat zu Pyro-Glutamat und ist im Gehirn von Alzheimer-Patienten stark überexprimiert. Wie bereits erwähnt, sind A β -Pyro-Glutamat-Peptide wesentlich toxischer und widerstandsfähiger gegenüber enzymatischer Degradation als unmodifizierte A β -Peptide. Außerdem bilden die modifizierten pGlu-A β -Peptide Kristallisationskeime, die die Proteinablagerung in den Plaques noch verstärken können. In verschiedenen Alzheimer-Tiermodellen wurde gezeigt, dass eine Inhibition der Glutaminylzyklase eine Reduktion von pGlu-A β und Gesamt-A β zur Folge hat. Damit verbesserten sich die Symptome, insbesondere die Gedächtnisleistung der Tiere (Schilling *et al.* 2008, Wirths *et al.* 2009).

Hemmung der Tau-Aggregation

Zwei weitere Ansatzpunkte für die Behandlung der Alzheimer-Demenz und anderen Tauopathien ist der Einsatz von Tau-Aggregations- und Tau-Kinase-Inhibitoren. Tau-Aggregationshemmer sollen die Bildung der neurotoxischen neurofibrillären Bündel unterbinden bzw. diese auflösen und so den Nervenzelluntergang verhindern. Bemerkenswert sind die kürzlich veröffentlichten Daten der Phase-II-Studie des Tau-Aggregations-Inhibitors RemberTM (Methylthioniniumchlorid (MTC), Methylenblau, Abbildung 4) von TauRx Therapeutics Ltd. (Singapur). Seine Wirksamkeit wurde bereits in transgenen Tiermodellen erkannt. MTC führt zu einer Besserung der kognitiven Leistungsfähigkeit und einem Rückgang pathologischer Veränderungen im ZNS (Harrington *et al.* 2008). Die Wirksamkeit von MTC wurde in einer doppelblinden, randomisierten, placebokontrollierten Phase-II-Studie mit 321 Probanden über einen Zeitraum von 84 Wochen überprüft. Nach 24 Wochen zeigte die Gruppe mit mittelschwerer Demenz eine

Besserung der Symptome im Vergleich zur Placebogruppe. Des Weiteren konnte eine Stabilisierung der Erkrankungsprogression über 50 Wochen bei Patienten mit leichter und mittelschwerer Demenz erreicht werden (Wischik *et al.* 2008). Diese Ergebnisse müssen nun in einer Phase-III-Studie bestätigt werden. Obwohl pharmakodynamische und pharmakokinetische Daten der Phase-II-Studie noch nicht veröffentlicht wurden, scheint die Strategie der Tau-Aggregations-Inhibition ein vielversprechender Ansatz zu sein (Bulic *et al.* 2009).

Schutzimpfung gegen Bildung von A β -Peptiden

Die Immunisierung gegen A β -Peptide stellt eine weitere mögliche Behandlungsoption dar. Schenk *et al.* (1999) zeigten in ihrem Mausmodell, dass es nach einer Immunisierung mit A β_{42} -Peptiden zu einer Verbesserung der kognitiven Leistungsfähigkeit der Mäuse kam. Elan Pharmaceuticals (USA) entwickelte eine aktive Immuntherapie (AN-1792) zur Behandlung der Alzheimerschen Krankheit. Bei der Erprobung am Menschen traten bei einigen Probanden jedoch schwerwiegende Nebenwirkungen auf. Sechs Prozent der Teilnehmer entwickelten eine aseptische Meningoenzephalitis. Daraufhin wurde die klinische Phase-II-Studie abgebrochen (Chek *et al.* 2002). Des Weiteren befindet sich Baxters Immunglobulin Gammagard® in Phase II (Weksler *et al.* 2005). Außerdem haben drei weitere passive Impfstoffe PF-04360365 (Pfizer), GSK933776A (GlaxoSmithKline) und R1450 (Hofmann-LaRoche) die präklinische Phase überwunden. Zurzeit laufen mehrere Studien mit veränderten Impfstoffen, deren Ergebnisse noch ausstehen (Town 2009, ClinicalTrials.gov).

Dimebolin (Latrepirdin) verbessert Symptomatik von Alzheimer-Patienten

Das in Russland zur Behandlung allergischer Reaktionen zugelassene Antihistaminikum Dimebolin (Abbildung 4), auch Latrepirdin genannt, wird gegenwärtig als Therapieoption bei der Alzheimer-Demenz untersucht. In einer 2007 von Medivation, Inc. (USA) durchgeführten Phase-II-Studie profitierten Alzheimer-Patienten von der Einnahme von Dimebolin erheblich im Vergleich zur Placeboeinnahme (Doody *et al.* 2008). Des Weiteren wurde bereits eine Phase-III-Studie durchgeführt. Die Auswertung der Daten wurde aber noch nicht veröffentlicht (ClinicalTrials.gov).

Der genaue Wirkmechanismus von Dimebolin ist noch nicht bekannt. Bachurin *et al.* (2001) konnten zwar in ihren Untersuchungen eine Hemmung der Acetylcholinesterase und eine antagonistische Wirkung am NMDA-Rezeptor nachweisen. Allerdings wird von diesen

Wirkmechanismen nicht länger angenommen, dass sie wesentliche Mechanismen der Dimebolin-Wirkungsweise sind (Sabbagh und Shill 2010).

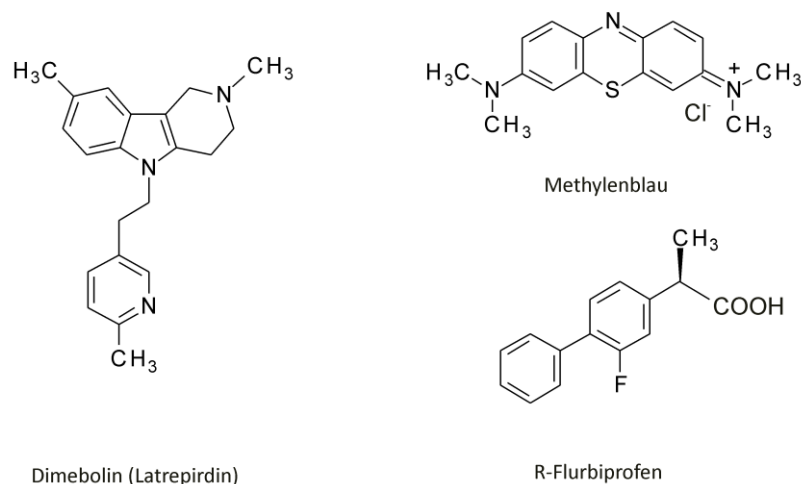


Abbildung 4 | Neue Arzneistoffe zur Behandlung der Alzheimer-Demenz

Multi-Target-Kombinationstherapie zur Behandlung von Erkrankungen mit multifaktorieller Genese

Die Komplexität der meisten neurodegenerativen Erkrankungen gestaltet eine erfolgreiche medikamentöse Behandlung schwierig. Bisher konnte diese nur unzureichend therapiert werden. Ein Grund könnte in der sogenannten Einzel-Target-Strategie (Abbildung 5) zu finden sein. Neuere Untersuchungen (errechnete Netzwerk-Modelle) lassen darauf schließen, dass eine partielle Inhibition und/oder Aktivierung mehrerer therapeutischer Targets bei Erkrankungen mit multifaktorieller Genese wirksamer sein könnte als eine vollständige Inhibition bzw. Aktivierung eines einzelnen Targets. Multi-Target-Wirkstoffe weisen dabei häufig eine geringere Bindungsaffinität zur ihrer Zielstruktur auf, was auch das geringere Nebenwirkungsspektrum erklären könnte. Zusätzlich würden Patienten durch die verbesserte Compliance profitieren. Daher wird heute schon häufig eine Kombinationstherapie mit AChE-Hemmern und Memantin durchgeführt. Die Verwendung bzw. Entwicklung neuerer Multi-Target-Wirkstoffe brächte den Vorteil synergistischer Effekte durch Angriff an verschiedenen Zielstrukturen (Csermely *et al.* 2005, Cavalli *et al.* 2008).

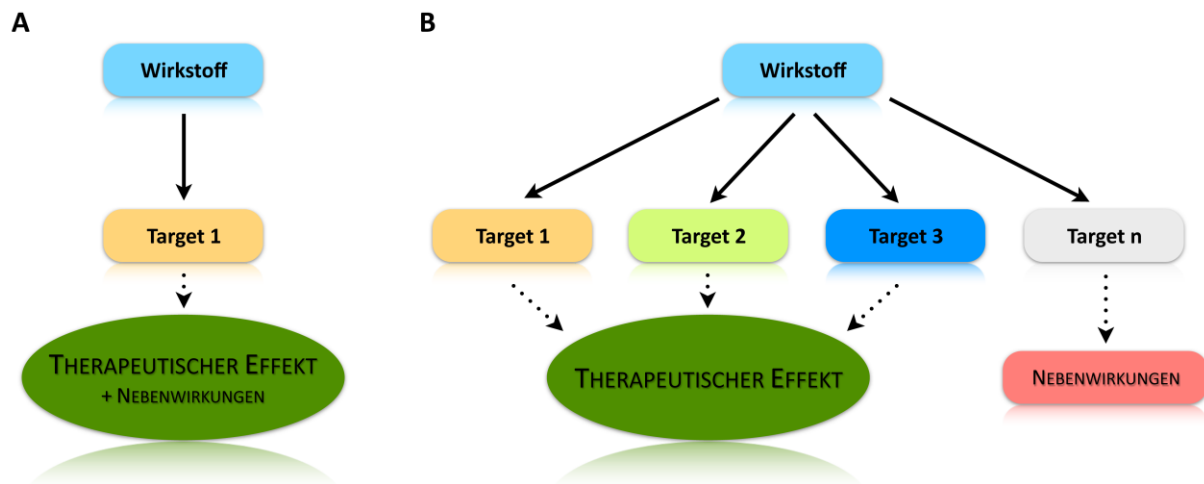


Abbildung 5 | Neue Medikationsstrategie zur Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen (nach Cavalli *et al.* 2008)

(A) Ein-Target-Paradigma: Eine Vielzahl von verfügbaren Medikamenten sind nur auf eine einzelne Zielstruktur ausgerichtet. (B) Multi-Target-Wirkstoffe: Als neuer Ansatz in der pharmazeutischen Forschung für Erkrankungen mit multifaktorieller Genese. Ein Wirkstoff bindet an verschiedenen Zielstrukturen, um so besser in der Kaskade von pathologischen Prozessen besser eingzugreifen zu können. Damit können auch sogenannte „Backup“-Prozesse des Körpers besser umgangen werden. Außerdem sollen synergistische Effekte besser genutzt werden.

2.2. Apolipoprotein E

Apolipoprotein E (ApoE) ist der wichtigste Lipid-Transporter im menschlichen Gehirn und beteiligt an der Aufrechterhaltung und Reparatur von Neuronen. Für die ApoE-Protein-Familie besteht eine unterschiedliche, Isoform-abhängige Beteiligung an verschiedenen neuropathologischen Veränderungen im Gehirn. Apolipoprotein E4 (ApoE4), kodiert durch das $\epsilon 4$ -Allel, gilt als gesicherter genetischer Risikofaktor für die sporadische, spät beginnende Form der Alzheimer-Demenz (Bertram und Tanzi 2008). Es besteht ein signifikanter Gen-Dosis-Effekt für die Erkrankungshäufigkeit und das Alter der Erstmanifestation. Apolipoprotein E wird hierbei mit vielen pathologischen Prozessen der Alzheimerschen Erkrankung in Verbindung gebracht, wie z. B. Modulierung des Auf- und Abbaus sowie Clearance von A β -Peptiden und deren Ablagerung in senilen Plaques (Sadowski *et al.* 2006), cholinerge Dysfunktion, Lipid-Dysfunktion, gesteigerter oxidativer Stress, mitochondriale Dysfunktion und schließlich Apoptose neuronaler Zellen (Mahley *et al.* 2006, Cedazo-Mínguez 2007). Verschiedene Forschergruppen sehen das Apolipoprotein E als geeignetes Target für eine therapeutische Intervention bei der Alzheimer-Demenz.

2.2.1. Struktur und Funktion von Apolipoprotein E

Apolipoprotein E ist ein polymorphes, Lipid-komplexierendes, Arginin-reiches Lipoprotein und wurde erstmalig von Shore und Shore (1973) beschrieben. Es ist Bestandteil von Chylomikronen, dem *very low density lipoprotein* (VLDL), dem *high density lipoprotein* (HDL) und vermittelt den Transport von Triglyceriden sowie von körpereigenem und exogenem Cholesterin. Apolipoprotein E ist ein Ligand für den LDL-Rezeptor, der für die zelluläre Aufnahme von Lipiden verantwortlich ist (Mahley 1988). Außerhalb des Lipidstoffwechsels werden dem ApoE weitere Aufgaben zugeschrieben, wie die Modulation der zellulären Immunantwort, Hemmung der Thrombozytenaggregation und Regulation der Steroidsynthese (Ishigami *et al.* 1998). Des Weiteren beeinflusst ApoE im peripheren Nervensystem das Wachstum von Neuronen (Handelmann *et al.* 1992, Holtzman und Fagan 1998). Hauptbildungsorte sind Leber und Gehirn, aber auch in anderen Organen wurden hohe mRNA-Expressionslevel nachgewiesen (Mahley 1988). Im Gehirn wird ApoE hauptsächlich von Astrozyten gebildet und sezerniert. Jedoch wurde die Expression auch in Neuronen und Mikrogliazellen nachgewiesen (Mahley *et al.* 2006).

2.2.2. Hauptisoformen von Apolipoprotein E

Die polymorphe Eigenschaft des Apolipoproteins E wurde von Utermann *et al.* (1977) durch multiple Banden bei der isoelektrischen Fokussierung erkannt und mittels 2D-Elektrophorese von Zannis *et al.* (1981) bestätigt. Durch diese Analysen konnte nachgewiesen werden, dass es drei Hauptisoformen (ApoE2, ApoE3 und ApoE4) mit unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften gibt. So variiert zum Beispiel der isoelektrische Punkt zwischen 5 und 6 (Utermann *et al.* 1975). Die ApoE-Isoformen werden durch die Allele $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ und $\epsilon 4$ (Abbildung 6) auf Chromosom 19 codiert.

	112	158
	Cys	Cys
<i>APOE</i> $\epsilon 2$...GAC GTG TGC GGC CGC CTG ... CTG CAG AAG TGC CTG GCA...	
	Cys	Arg
<i>APOE</i> $\epsilon 3$...GAC GTG TGC GGC CGC CTG ... CTG CAG AAG CGC CTG GCA...	
	Arg	Arg
<i>APOE</i> $\epsilon 4$...GAC GTG CGC GGC CGC CTG ... CTG CAG AAG CGC CTG GCA...	

Abbildung 6 | Isoform-bestimmende Nukleotidsequenz des humanen *APOE*-Gens

Außerdem sind weitere sehr seltene *APOE*-Varianten (*APOE* ϵ 1, *APOE* ϵ 5 und *APOE* ϵ 7) bekannt. Damit ergeben sich für die Hauptisoformen drei homozygote (E2/E2, E3/E3 und E4/E4) und drei heterozygote (E3/E2, E3/E4, E2/E4) Genotyp. Der Genotyp E3/E3 ist mit 60 % der in Deutschland häufigste vorkommende und wird im Allgemeinen als „Wildtyp“ bezeichnet (Utermann *et al.* 1982). In Tabelle 2 sind die verschiedenen Allelfrequenzen der vorkommenden Genotypen sortiert nach Studien zusammengefasst dargestellt.

Tabelle 2 | Allelfrequenzen von Apolipoprotein E (modifiziert nach Mahley *et al.* 1988)

Genotyp	Allelfrequenz [%]		Bewertung des Krankheitsrisikos der verschiedenen Phänotypen
	Utermann <i>et al.</i> 1982 (1031 Individuen)	Menzel <i>et al.</i> 1983 (1000 Individuen)	
E3/E3	60	63	„Wildtyp“, keine Krankheitsassoziation
E4/E4	3	2	starke Assoziation zur koronaren Herzkrankheit, gestörter Lipidstoffwechsel mit Hypertriglyceridämie, erhöhtes Krankheitsrisiko für Morbus Alzheimer
E2/E2	1	1	starke Assoziation zur Hyperlipoproteinämie Typ III
E4/E3	23	20	gemilderte Symptomform des Genotyps E4/E4
E4/E2	2	3	leichte Assoziation zur Hyperlipoproteinämie Typ III
E3/E2	12	11	leichte Assoziation zur Hyperlipoproteinämie Typ III

Das primäre Apo-E-Translations-Produkt (Precursor-Protein) besteht aus 317 Aminosäuren, davon bilden 18 Aminosäuren das Signalpeptid. Die Proteinsequenz des prozessierten Apolipoproteins E besteht aus 299 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 34,2 kDa (Mahley 1988). Die drei Hauptisoformen unterscheiden sich durch einzelne Punktmutationen in der Nukleotidsequenz des humanen *APOE*-Gens voneinander. Durch die mutierten Basen kommt es zu einem Aminosäureaustausch an den Positionen 112 und 158 (Abbildung 6) ApoE3 hat an Position 112 ein Cystein und an Position 158 ein Arginin. Dagegen besitzt ApoE4 an beiden Positionen ein Arginin und ApoE2 ein Cystein. Die Cystein-Arginin-Substitution führt zu Struktur- und Stabilitätsveränderungen des Proteins mit Auswirkung auf biologische Funktionen zum Beispiel den Lipidstoffwechsel. Außerdem wird durch den Aminosäureaustausch die Ladung der Proteine verändert. So trägt ApoE2 im Vergleich zu ApoE3 eine positive Ladung weniger, ApoE4 hingegen eine Ladung mehr (Weisgraber *et al.* 1985, Stanley *et al.* 1986). Denaturierungsstudien zeigen deutliche Unterschiede hinsichtlich der Proteolyseanfälligkeit der ApoE-Isoformen. ApoE4 degradiert von allen drei Formen am schnellsten, ApoE3 und ApoE2 sind dagegen wesentlich stabilere Formen.

Apolipoprotein E besteht aus zwei strukturellen Domänen (Abbildung 7A): einer 22 kDa schweren N-terminalen Domäne (AS 1-191) mit der LDL-Rezeptor-Bindestelle (AS 136-150) und einer 10 kDa schweren C-terminalen Domäne (AS 216-299), die die Haupt-Lipid-Bindestelle enthält (AS \approx 240-270). Die Interaktion zwischen der N- und C-terminalen Domäne ist eine Besonderheit der Isoform ApoE4 (Abbildung 7B). Der Aminosäureaustausch an Position 112 zu Arginin ermöglicht die Bildung einer Salzbrücke zwischen Arginin-61 und Glutamat-255. Notwendig für die Domäneninteraktion ist die positive Ladung von Arginin-112, diese kann aber nicht direkt mit der C-terminalen Domäne in Wechselwirkung treten, dafür ist Arginin-61 als Schlüssel-Mediator erforderlich. Eine direkte Folge der Interaktion ist die Beeinflussung der Lipid-Bindestelle. ApoE4 bevorzugt die Bindung an große, triglyceridreiche VLDL-Partikel. Im Gegensatz zu ApoE3 und ApoE2 die bevorzugt eher an kleinere, phospholipidreiche HDL-Partikel binden (Dong und Weisgaber 1996, Huang *et al.* 2004). Eine mögliche Interventionsstrategie für die ApoE4-abhängige Domänen-Interaktion wäre die Unterbindung der Wechselwirkung zwischen Arginin-61 und Glutamat-255. Durch Verwendung von kleinen strukturregierenden Molekülen (Abbildung 7B), könnte eine ApoE3-ähnliche Struktur hergestellt werden, um die normale Funktion zu gewährleisten (Mahley *et al.* 2006).

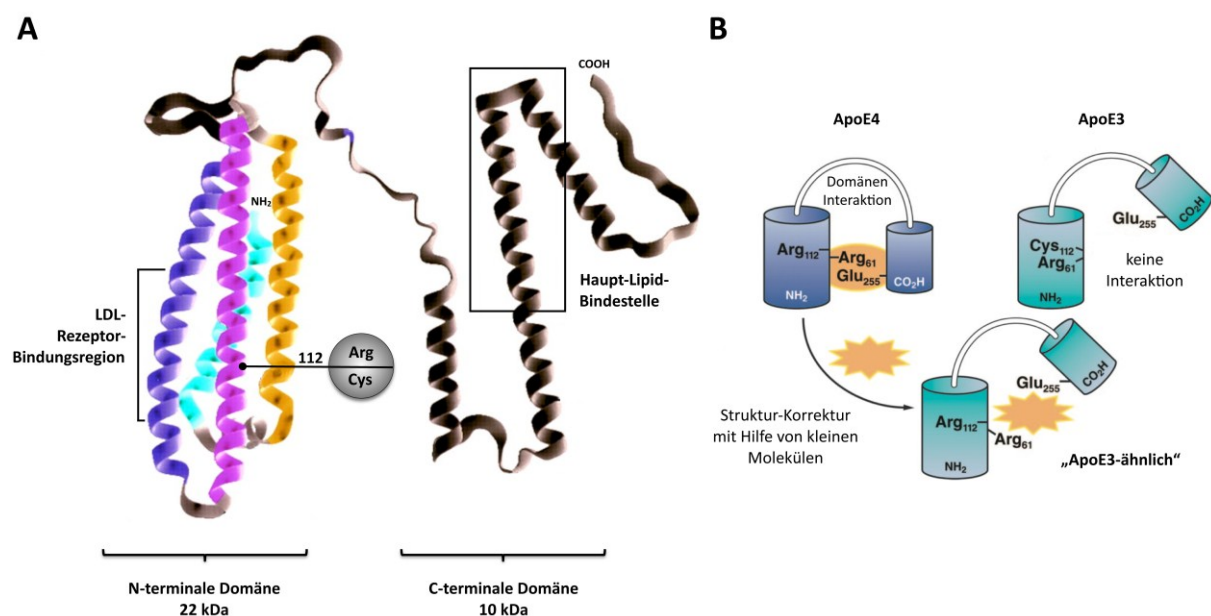


Abbildung 7 | Modell-Darstellung des humanen Apolipoproteins E und der ApoE4-Domänen-Interaktion (modifiziert nach Huang *et al.* 2001, Mahley *et al.* 2006)

(A) Modell des humanen Apolipoproteins E mit wichtigen strukturellen Regionen (LDL-Rezeptor-Bindungsregion, Lipid-Bindestelle) und Mutationsstelle für die Isoformen ApoE3 und ApoE4 (B) Vereinfachte Darstellung der ApoE4-abhängigen Domänen-Interaktion im Vergleich zu ApoE3 und mögliche Beeinflussung der Wechselwirkung der Domänen mit Hilfe von Struktur-Korrektur-Molekülen (orangefarbenes Symbol).

2.2.3. Die Rolle von ApoE bei der Pathogenese der Alzheimer-Demenz

Der ApoE-Polymorphismus scheint als Risikofaktor bei Morbus Alzheimer eine wichtige Rolle zu spielen (Tabelle 2). Bezüglich des $\epsilon 4$ -Allels besteht ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Alzheimer-Demenz. Die zugrunde liegenden zellulären Mechanismen sind noch weitgehend unbekannt. Verschiedene Untersuchungen *in vivo* und *in vitro* zeigen eine Beeinflussung der A β -Produktion und A β -Clearance, die zu einer gesteigerten Plaque-Ablagerung führt (Mahley *et al.* 2006). Zusätzlich scheint ApoE4 *in vitro* die Hyperphosphorylierung und Aggregation von Tau zu begünstigen, was zu einer Destabilisierung des neuronalen Cytoskeletts führt (Huang *et al.* 2004).

Unter bestimmten Umständen wird ApoE auch von Neuronen gebildet, zum Beispiel für Reparaturprozesse geschädigter Zellen. Dabei wird ApoE durch eine neuronenspezifische, Chymotrypsin-ähnliche Serinprotease an Position Met-272 und/oder Leu-268 proteolytisch gespalten. Durch Konformationsänderungen im Protein ist ApoE4 im Vergleich zu ApoE3 in höherem Maße anfällig für Proteolyse (Harris *et al.* 2003). Im Gehirn von AD-Patienten und in transgenen Tiermodellen wurden C-terminal-geschnittene Fragmente von ApoE nachgewiesen (Harris *et al.* 2003). In genetisch veränderten Mäusen, die neurodegenerative Veränderungen im Gehirn und signifikante Defizite bei Lernverhalten und Gedächtnisleistung aufwiesen, war nach 7 Monaten eine Anreicherung von ApoE4-Fragmenten zu beobachten, die mit einem Anstieg der Tau-Phosphorylierung assoziiert war (Brecht *et al.* 2004, Chang *et al.* 2005). Tolar *et al.* (1997) konnten die Neurotoxizität von N-terminalen 22 kDa schweren Thrombin-Spaltprodukten (AS 1-191) unter Zellkulturbedingungen in Neuronen nachweisen. Dabei zeigte sich, dass ApoE4-Spaltprodukte *in vitro* neurotoxischer waren als ApoE3-Spaltprodukte. Aus ApoE4 durch Proteolyse entstandene Fragmente scheinen ein ursächlicher Faktor für neuropathologische Veränderungen im Gehirn zu sein. Die Neurotoxizität korreliert mit der Translokation von Fragmenten ins Cytosol. So können sie mit Komponenten des Cytoskeletts und/oder mit den Mitochondrien interagieren und diese schädigen. Die Konformation des C-Terminus scheint ein Schlüsselfaktor für die Bildung neurotoxischer Fragmente zu sein. Dabei spielen die LDL-Rezeptor- und Lipid-Bindestelle eine entscheidende Rolle für Translokation und Akkumulation von Fragmenten im Cytosol (Mahley *et al.* 2006). Abbildung 8 gibt einen Überblick über verschiedene, potentiell neurotoxische ApoE-Fragmente.

Neben den schon beschriebenen Effekten können ApoE-Fragmente einen Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels verursachen und somit zusätzlich zur Neurotoxizität beitragen. Der vermehrte Einstrom von Calciumionen könnte mit der Beeinflussung von Glutamat-Rezeptoren in Zusammenhang stehen. Tolar *et al.* (1999) zeigten, dass das synthetisch hergestellte ApoE-Peptid (AS (141-149)²) *in vitro* den Calciumeinstrom verstärkt. Außerdem konnte der Calciumeinstrom durch gleichzeitige Zugabe von MK-801 blockiert werden. Dies lässt vermuten, dass NMDA-Rezeptoren involviert sind (Tolar *et al.* 1999).



Abbildung 8 | Übersicht über potentiell neurotoxische ApoE/ApoE4-Fragmente, die möglicherweise in neuro-pathologische Veränderungen involviert sind (modifiziert nach Mahley *et al.* 2006)

LDL-Rezeptor-Binderegion (dunkelrot, bezeichnet als LDL, AS 136-150), Haupt-Lipid-Binderegion (grün, bezeichnet als Lipid, AS 240-270), MG (Molekulargewicht), AS (Aminosäureposition), k. A. (keine Angabe)

(1) ApoE4-Fragment, AS 1-272 (Huang *et al.* 2001, Harris *et al.* 2003), (2) Thrombin-Spaltprodukt, AS 1-191 (Marques *et al.* 1996, Tolar *et al.* 1997), (3) ApoE4-Fragment, AS 127-272 (Chang *et al.* 2005), (4) Tandem-ApoE(141-155)²-Peptid (Moulder *et al.* 1999).

Ein weiterer Aspekt, der zunehmend diskutiert wird, ist die mögliche Dysregulation der zerebralen Cholesterolumöostase durch ApoE4. Epidemiologische Studien zeigen eine Reduzierung des Risikos für eine Alzheimer-Erkrankung durch den Einsatz von cholesterolsenkenden Medikamenten (Statinen) (Jick *et al.* 2000). Es gibt erste Hinweise, dass die Prozessierung des APPs cholesterolsensitiv erfolgt. *In-Vitro*-Experimente zeigten, dass hohe intrazelluläre Cholesterolspiegel die Aktivität von beteiligten β - und γ -Sekretasen verstärken. Die Folge ist eine erhöhte Bildung von A β -Peptiden in der Zelle (Vance *et al.* 2005). ApoE unterliegt auch in neuronalen Zellen einem Isoform-spezifischen Recycling. ApoE4 wird dabei vermindert rückgewonnen, was mit einem reduzierten Cholesterol-Efflux aus Neuronen und Astrozyten in Verbindung gebracht wird (Michikawa *et al.* 2000). Damit

steigt der intrazelluläre Cholesterinspiegel stärker als normal an. Die Interaktionen zwischen Cholesterol und A β -Formation sind komplex. Sehr wahrscheinlich ist, dass ApoE als Bindeglied in modulierender Form beteiligt ist.

Es ist davon auszugehen, dass ApoE direkt oder indirekt in die Pathogenese der Alzheimer Demenz involviert ist und könnte somit ein neues Target für Behandlung von Patienten darstellen.

2.3. Der N-Methyl-D-Aspartat-Ionenkanalrezeptor

Der N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor (NMDAR) gehört zur Familie der ionotropen Glutamat-Rezeptoren und ist an grundlegenden kognitiven Prozessen wie Lernen und Gedächtnisbildung beteiligt. Unter den erregenden Neurotransmitter-Rezeptoren des Zentralnervensystems nimmt er eine zentrale Rolle ein. Namensgebend für den Rezeptor ist der nicht-natürliche Agonist N-Methyl-D-Aspartat (NMDA). Die physiologische Aktivierung erfolgt durch L-Glutamat. Die Aminosäure L-Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im ZNS. Sie kommt hier in relativ hoher Konzentration (10 mM) vor, wobei große Teile vesikulär gespeichert sind (Fonnum *et al.* 1998).

Der NMDA-Rezeptor ist ein spannungsabhängiger, ligandengesteuerter Ionenkanal und vollständig permeabel für Natrium-, Kalium und Calciumionen. Über den Calciumeinstrom können verschiedene *second-messenger*-Systeme aktiviert werden.

Eine Besonderheit stellen der Co-Agonismus von L-Glutamat und Glycin sowie die Spannungsabhängigkeit zur Aktivierung des Ionenkanals dar. Erst wenn die Zellmembran depolarisiert ist und gleichzeitig die Agonisten L-Glutamat und Glycin binden, erfolgt die Kanalöffnung und damit ein Ionenfluss. Magnesium agiert hierbei als spannungsabhängiger Antagonist, der bei normalem Membranpotential in der Kanalpore bindet und den Kanal blockiert. Erst eine partielle Depolarisation ermöglicht die Freisetzung der Magnesiumionen aus dem Kanal und ein Ionenfluss kann stattfinden. Eine solche Spannungsänderung kann durch benachbarte Rezeptoren (z. B. AMPA-Rezeptoren) oder durch tetanische Reizung hervorgerufen werden.

2.3.1. Rezeptoraufbau

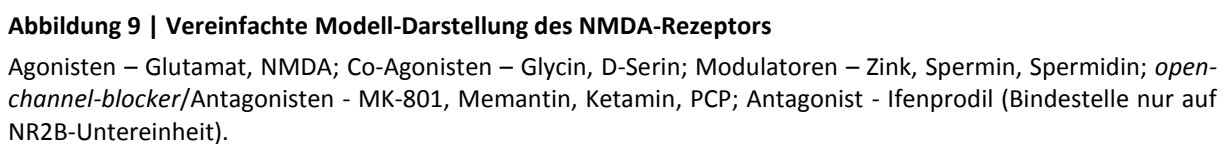
NMDA-Rezeptoren werden hauptsächlich im gesamten Zentralnervensystem exprimiert. Sie wurden aber auch in peripheren Geweben und Organen nachgewiesen, so z. B. in Lunge, Dünndarm, Herz, Nebennieren und Pankreas, sowie in Knochenzellen, Hautzellen und

Thrombozyten (Skerry *et al.* 2001). Der NMDA-Rezeptor ist ein heteromultimerer Proteinkomplex, der aus drei verschiedenen Klassen von Untereinheiten (NR1, NR2 und NR3) aufgebaut ist (Cull-Candy *et al.* 2001). NR1 wird von einem Gen kodiert und in acht bekannte Varianten gespleißt (NR1-1a - NR1-1h). Die Bindungsstelle des Co-Agonisten Glycin ist an dieser Untereinheit lokalisiert. Für NR2 sind vier verschiedene Proteine (NR2A-D) bekannt, die durch verschiedene Gene kodiert werden. An der NR2-Untereinheit befindet sich die Bindestelle für den Agonisten L-Glutamat.

Über NR3 ist nur wenig bekannt. Bis jetzt sind zwei verschiedene Untereinheiten (NR3A und NR3B) beschrieben worden (Nishi *et al.* 2001). Funktionelle NMDA-Rezeptoren werden aus vier oder fünf Untereinheiten gebildet. Der häufigere tetramere Proteinkomplex setzt sich aus zwei NR1-Untereinheiten und zwei beliebigen NR2-Untereinheiten zusammen, wobei die NR1-Untereinheit für einen funktionsfähigen Ionenkanal notwendig ist. Ebenso essentiell ist das Vorhandensein der Bindestellen für L-Glutamat und Glycin. Die verschiedenen Untereinheiten zeigen altersabhängig und regionabhängig ein unterschiedliches Expressionsmuster im Gehirn. Im Gegensatz zur NR1-Untereinheit, die ubiquitär exprimiert wird, zeigen die NR2-Untereinheiten diskrete Verteilungen in den verschiedenen Hirnregionen. Die Subtypen NR1/NR2A und NR1/NR2B findet man in hoher Dichte im Cortex und Hippocampus von erwachsenen Säugetieren (Ozawa *et al.* 1998). Der NR1/NR2B-Subtyp ist außerdem in den Basalganglien lokalisiert (Tsai *et al.* 2002). Während der NR1/NR2C-Subtyp vorwiegend im Cerebellum (Kleinhirn) und Rückenmark zu finden ist, kommt der NR1/NR2D-Subtyp verstärkt im Hirnstamm und Diencephalon (Zwischenhirn) vor (Stephenson 2001). Die Kombination aus verschiedenen Untereinheiten führt zu veränderten pharmakologischen, elektrophysiologischen und biochemischen Eigenschaften der jeweiligen Rezeptorkanäle (Cull-Candy *et al.* 2001).

2.3.2. Wichtige Bindungsstellen am NMDA-Rezeptor

Zusätzlich zu den Bindungsstellen von NMDA bzw. L-Glutamat und Glycin gibt es weitere Bindungsstellen, die die Aktivität des Ionenkanalrezeptors nachhaltig beeinflussen können. Wie bereits erwähnt, befindet sich die spannungsabhängige Magnesium-Bindestelle im Inneren des Ionenkanals (Abbildung 9). Zusätzlich können Magnesiumionen aber auch außerhalb binden. Zinkionen können über eine außerhalb der Kanalpore lokalisierte Bindungsstelle inhibitorische und modulatorische Effekte vermitteln (Paoletti *et al.* 1997).



Die *open channel blocker* interagieren nicht mit den Bindungsstellen für L-Glutamat und Glycin (nicht-kompetitiver Antagonismus), sondern „verstopfen“ den geöffneten Kanal. Damit sind sie in der Lage, pathologisch überaktivierte NMDA-Rezeptoren zu blockieren und

in der Folge den übermäßigen Einstrom von Ca^{2+} -Ionen zu verhindern. Die *open channel blocker* eignen sich unterschiedlich gut für therapeutische Zwecke. Aufgrund einer starken psychomimetischen und halluzinogenen Wirkung besitzt MK-801 keine therapeutische Bedeutung. Phencyclidin wird wegen seiner dissoziativen Wirkung gar missbräuchlich als halluzinogene Droge (*angel dust*, Engelsstaub) verwendet.

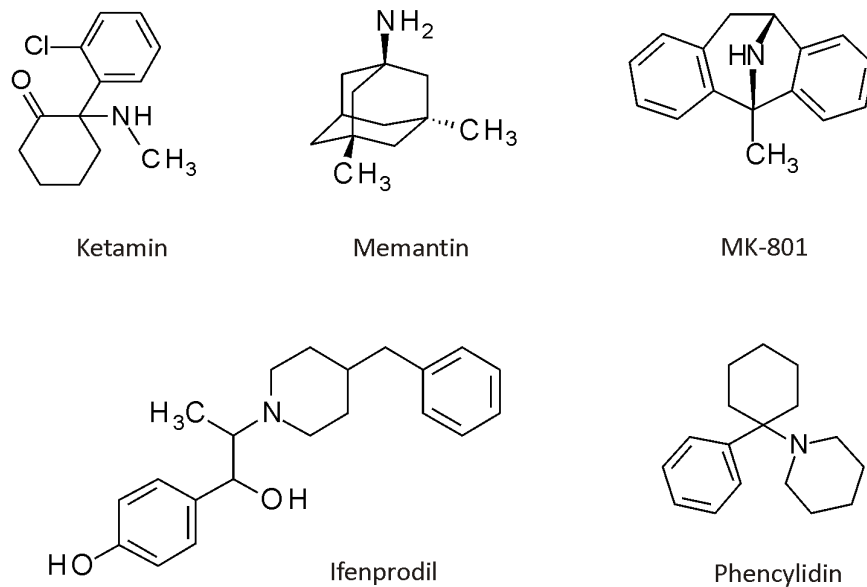


Abbildung 10 | Bekannte NMDA-Antagonisten

Ein weiterer affiner NMDA-Antagonist (*open channel blocker*) ist das Phencyclidin-Derivat Ketamin. Es blockiert den NMDA-Rezeptor durch Bindung an die Phencyclidin-Bindungsstelle. S-(+)-Ketamin blockiert den NMDA-Rezeptor viermal potenter als das entsprechende R-(-)-Enantiomer. Ketamin verteilt sich nach intravenöser Injektion rasch im Organismus und ruft eine „dissoziative Anästhesie“ hervor. Es wird vorwiegend renal in Form von Metaboliten ausgeschieden. Außerdem verfügt Ketamin über eine analeptische und starke analgetische Wirkung. Sehr häufig treten aber unter Ketamin-Narkosen psychotrope Nebenwirkungen (σ -Rezeptorwirkung) wie Halluzinationen und unangenehme Träume auf (Mutschler *et al.* 2001). Aufgrund der narkotischen Wirkung und unerwünschten pharmakologischen Eigenschaften wird Ketamin nicht als Demenz-Medikament eingesetzt.

Wie bereits in Kapitel 2.1.4. erwähnt, ist Memantin zurzeit der einzige Glutamatantagonist, der zur Behandlung der Alzheimer-Demenz zu gelassen ist. Memantin (Derivat des Amantadins) zählt zu den moderat-affinen, nicht-selektiven NMDA-Antagonisten. Durch die

rasche Rezeptor-Kinetik geht man davon aus, dass die Bindestelle in der Kanalpore eher extrazellulär zu finden ist. Zusätzlich wird ein spannungsabhängiger Bindungsmodus (ähnlich wie bei Magnesium) als Vorteil angesehen (Parson *et al.* 1999). Damit kann die schädliche Überaktivierung des NMDA-Rezeptors verhindert werden. Nach Normalisierung ist eine Weiterleitung physiologischer Signale aber wieder möglich. Memantin wird nach peroraler Applikation schnell und vollständig resorbiert, die Ausscheidung erfolgt vorwiegend renal in unveränderter Form (Mutschler *et al.* 2001).

Ein anderer bekannter selektiver nicht-kompetitiver NMDA-Ligand ist Ifenprodil. Dieser zeigt an bestimmten NMDA-Rezeptoren eine antagonistische Aktivität im nanomolaren Konzentrationsbereich. Ifenprodil und dessen Derivate binden selektiv in der Nähe der Zinkbindestelle an die NR2B-Untereinheit (Williams 1993, Mony *et al.* 2009). Diese Selektivität könnte zur Verbesserung von Nebenwirkungsprofilen und zu einer gezielten Therapie beitragen. Nachteilige Effekte von Ifenprodil sind jedoch Affinitäten zu 5-HT_{1A}-, 5-HT₂- und σ -Rezeptoren sowie die Beeinflussung von spannungsabhängigen Calciumkanälen (Stark *et al.* 2000b).

Des Weiteren wirken endogene Polyamine wie Spermin und Spermidin (Abbildung 11) modulierend auf den NMDA-Rezeptor. Dabei handelt es sich um aliphatische Amine mit mehreren N-Atomen, die bei physiologischem pH-Wert positiv geladen sind. Extrazellulär vorkommenden Polyaminen werden vielfältige Effekte am NMDA-Rezeptor zugesprochen. Dazu zählen in niedrigen Konzentrationen verstärkende, in höheren Konzentrationen inhibierende Eigenschaften (Benveniste und Mayer 1993). Spermin und Spermidin zeigen drei verschiedene Effekte: eine spannungsabhängige Blockade, eine Glycin-abhängige Stimulation sowie eine spannungs- und Glycin-unabhängige Stimulation. Die spannungsabhängige Blockierung resultiert aus dem Eindringen von Spermin in die Kanalpore (ähnlich der Magnesiumblockade) (Rock und MacDonald 1992). Die Polyamin-Blockade erfolgt nicht selektiv. Es bestehen lediglich Unterschiede in der Stärke zwischen den verschiedenen Untereinheiten. Bei NR2C- und NR2D-beinhaltenden NMDAR ist die Polyaminblockade weniger stark ausgeprägt als bei solchen mit NR2A- und NR2B-Untereinheiten (Williams *et al.* 1994).

Spermin und Spermidin können die NMDA-Rezeptor-Antwort auch verstärken, offensichtlich durch Erhöhung der Sensivität für Glycin. Dieser Effekt wird durch Bindung der Amine an die NR1-Untereinheit vermittelt (Abbildung 9, Benveniste und Mayer 1993). Die Glycin-

abhängige Stimulation wurde nur bei heteromeren NR1/NR2A- und NR1/NR2B-NMDAR beobachtet, nicht aber bei solchen mit NR2C- und NR2D-Untereinheiten (Williams *et al.* 1995). Der dritte Effekt, der eine spannungs- und Glycin-unabhängige Stimulation des NMDARs verursacht, erfolgt nur an Kanälen mit einer NR2B-Untereinheit (Williams *et al.* 1994). Bei physiologischen pH-Werten (7,3-7,5) verstärken Polyamine die NR1/NR2B-Antwort durch Verkleinerung des pK_s -Wertes des Protonen-Sensors. Es gibt eine Korrelation zwischen Protonen-Sensitivität und Grad der Polyamin-Stimulierung. Polykationische Polyamine wie Spermin und Spermidin sind somit in der Lage durch Abschirmen des Protonen-Sensors Glycin-unabhängig den NMDA-Rezeptorionenkanal zu stimulieren (Mony *et al.* 2009).

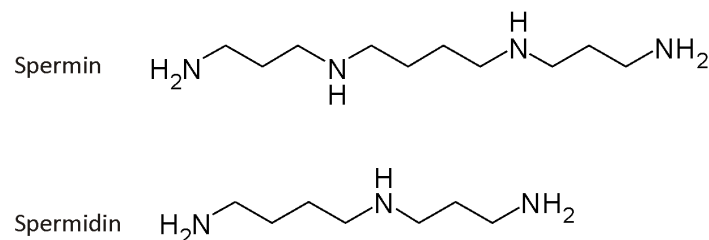


Abbildung 11 | Bekannte NMDA-Modulatoren

2.3.3. Glutamat-vermittelte Exzitotoxizität

Der NMDA-Rezeptor ist wichtig für neuronale Adaptionsvorgänge wie Lernprozesse und Gedächtnisbildung, die auch als synaptische Plastizität bezeichnet werden. Die physiologische, kurzzeitige Freisetzung von L-Glutamat und Glycin bildet dabei eine wichtige Grundlage für diese Prozesse. Wird durch pathophysiologische Vorgänge im Gehirn, wie bei Morbus Alzheimer und zerebraler Ischämie, jedoch Glutamat in größerem Umfang freigesetzt, kommt es zu einer Überaktivierung des NMDA-Rezeptors. Dies führt zu einem lang anhaltenden Calcium- und Natriumionen-Einstrom. Als Folge des verstärkten Natrium-Influx werden weitere spannungsabhängige Calciumkanäle geöffnet (Mody und MacDonald 1995). Die stark erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration führt schließlich zur Aktivierung nachgeschalteter Prozesse (*second-messenger-Systeme*), die in ihrer Gesamtheit zur Apoptose neuronaler Zellen führt (Stark *et al.* 2000a). Ursachen für eine unphysiologische hohe Konzentration an L-Glutamat im synaptischen Spalt sind durch β -Amyloid hervorgerufene Freisetzung aus Makrophagen und Mikrogliazellen sowie eine Störung der

Glutamattransporterfunktion (Danysz *et al.* 2000). Des Weiteren können große Mengen an L-Glutamat durch geschädigte Neuronen, zum Beispiel in Folge ischämischer Zustände, freigesetzt werden, die wiederum benachbarte Neuronen beeinflussen (Lipton 2006).

Dieser Vorgang einer Glutamat-vermittelten übermäßigen Exzitation (Erregung) mit nachfolgender Zellschädigung (Toxizität) durch Ca^{2+} -Einstrom wird als Exzitotoxizität bezeichnet (Rothman und Olney 1987).

2.4. *Pipturus argenteus* WEDD.

Um potentiell neuroprotektive Naturstoffe zu finden, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit verschiedene Pflanzen-Extrakte auf ihre antagonistische Wirkung am NMDA-Rezeptor untersucht. Ein methanolischer Extrakt von *Pipturus argenteus* WEDD. zeigte eine hohe inhibitorische Aktivität am NMDA-Rezeptor und wurde zur weiteren Analyse zu einer aktivitätsgeleiteten Fraktionierung herangezogen.



Systematische Einordnung

Abteilung: Spermatophyta

Unterabteilung: Angiospermae

Unterabteilung: Magnoliophytina

Klasse: Rosopsida

Unterklasse.: Rosidae

Ordnungsgruppe: Urticales

Familie: Urticaceae

Ordnung: *Pipturus*

Abbildung 12 | *Pipturus argenteus* WEDD. Familie Urticaceae (aus Banks' Florilegium, Bildtafel 656), systematische Einordnung nach Frohne und Jensen (1998)

Pipturus argenteus WEDD. (Abbildung 12) gehört zur Familie der Brennnesselgewächse (Urticaceae) und ist im pazifischen Raum beheimatet. Die immergrüne, subtropische Pflanze wächst als weitläufiger Strauch bis hin zu 8 m hohen Bäumen und hat elliptische, fein gezahnte Blätter (8-14 cm lang, 1-6 cm breit). Die Blattoberseite ist grün bis dunkelgrün im

Gegensatz zur Blattunterseite, die wegen der feinen weißen Haare eher silbrig-matt erscheint. *Pipturus argenteus* ist eine diözische Pflanze mit weißen kugelförmigen weiblichen Blüten, die in kleinen Gruppen (3 bis 7) separat angeordnet sind. Nach der Blütezeit von Januar bis Juni reifen kleine, 4-6 mm große, weiß-silbrige, maulbeerartige, süße Früchte heran, die von Kindern und Erwachsenen gern gegessen werden (Royal Botanic Garden & Domain Trust, Sydney Australia).

Traditionell werden Rinde und Blätter von *P. argenteus* im Inselstaat Vanuatu zur Behandlung von Furunkeln, zur Induktion eines Aborts und gegen Hepatitis genutzt. Außerdem findet es als „Allheilmittel“ und Tonikum für Kinder seine Anwendung (Bradacs 2008b). Des Weiteren wird die innere Rinde von den Aborigines in Australien auch zum Färben und als Naturfaser verwendet (SOWN Inc., Australia).

Wissenschaftliche Datenlage zu Inhaltsstoffen und Wirkungen

Für die Pflanze *P. argenteus* liegen zurzeit keine wissenschaftlichen Erkenntnisse über Inhaltsstoffe und pharmakologische Wirkung vor. Innerhalb der Gattung *Pipturus* gibt es lediglich einige Angaben zu *P. albidus*. Dieser Art werden antioxidative, antimikrobielle und antivirale Wirkungen zugeschrieben. Als potentiell wirksamkeitsbestimmende Inhaltsstoffe der Blätter sind (+)-Catechin, Chlorogensäure und Rutin beschrieben (Locher *et al.* 1995, Kartika *et al.* 2007).

2.5. Zielsetzung

Ausgehend von der demographischen Entwicklung in den Industrie- und Schwellenländern der letzten Jahrzehnte sowie unter Berücksichtigung aktueller Prognosen rechnet man bis zum Jahre 2025 weltweit mit einer Verdoppelung der Zahlen von Demenzerkrankungen auf 34 Millionen. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit der Entwicklung neuer potentieller Wirkstoffe und Leitstrukturen sowie einer weiterführenden Grundlagenforschung zum besseren Verständnis der Morbus Alzheimer zu Grunde liegenden pathologischen Prozesse.

Ein möglicher Therapieansatz ist der Einsatz von NMDA-Rezeptor-Antagonisten. Seit einigen Jahren wird Memantin erfolgreich zur Behandlung von AD-Patienten eingesetzt. Der therapeutische Nutzen beruht auf der Reduktion der Glutamat-vermittelten Exzitotoxizität im ZNS. Im Rahmen eines Screenings sollen Pflanzenextrakte und chemisch definierte Substanzen auf ihre antagonistische Wirkung am NMDA-Rezeptor untersucht werden. Aktive Extrakte sollen zur Identifizierung wirksamkeitsbestimmender Inhaltsstoffe einer aktivitätsgeleiteten Fraktionierung zugeführt werden.

Ein anderer Angriffspunkt zur Behandlung der Alzheimer-Demenz ist nach Mahley *et al.* (2006), Marques und Crutcher (2003) das Apolipoprotein E. ApoE4 gilt als gesicherter genetischer Risikofaktor für die sporadische Form der Alzheimer-Demenz. Es wird mit vielen biochemischen Störungen in Verbindung gebracht. Für die ApoE-Familie bestehen Isoform-abhängige Unterschiede in der Proteinstabilität. ApoE4 bildet aufgrund seiner veränderten Konformation in höherem Maße neurotoxische Fragmente als ApoE2 und ApoE3. Es sollte daher ein Testsystem entwickelt werden, um einerseits die neurotoxische Wirkung von ApoE4 und ApoE-Fragmenten belegen und untersuchen zu können und andererseits neuroprotektive wirkende Extrakte, Naturstoffe und chemisch-synthetisierte Verbindungen zu identifizieren. Für die Entwicklung des ApoE-Bioassays sollen verschiedene ApoE-Isoformen durch heterologe Expression gewonnen und für die Fusionsproteine ein Reinigungsprotokoll erarbeitet werden. Die Auswahl der zu testenden Extrakte und Syntheseprodukte erfolgt für beide Testsysteme nach ethnopharmazeutischen und indikationsbezogenen Gesichtspunkten.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Laborgeräte

Analysenwaagen	A 210 P, BP 210 P und MC 210 P (Sartorius, Göttingen)
Extraktionsapparatur	ASE® 100 Accelerated Solvent Extractor (Dionex, Sunnyvale, CA, USA)
CO ₂ -Inkubator	CO ₂ Single Chamber Water Jacketed Incubator, Model 3110 (Forma Scientific, Marietta, OH, USA)
Dampfsterilisator	Varioklav Dampfsterilisator (H+P Labortechnik, Oberschleißheim)
DC-Auftragegerät	AS 30 TLC Applicator, Software AS30WIN Version 1.8.00 (DESAGA, Heidelberg)
DC-Imager	Kamera: CabUVis, Software: DESAGA ProViDoc Version 4 (DESAGA, Heidelberg)
Elektrophorese	Minigel-Twin System, Protein (Biometra, Göttingen) PerfectBlue Doppelgelsystem Twin M, Protein (Pqrlab, Erlangen) PerfectBlue Gelsystem Mini, DNA (Pqrlab, Erlangen) XCell SureLock® Mini Cell, Protein (Invitrogen, Karlsruhe)
Elektroporator	Gene Pulser Xcell mit ShockPod (BIO-RAD, Hercules, CA, USA)
Gefriertrocknung	Freezemobile (Virtis, Gardiner, NY, USA) Alpha 2-4 (Christ, Osterode) ILMVAC PIA 100 (Intas, Göttingen)
Geldokumentation	Gel Jet Imager 2004 (Intas, Göttingen)
HPLC-Anlage	Varian Prostar, 335 LC Detector, Pumpen Model 210, Software Galaxie Chromatography Data System Version 1.9.302.530 (Varian, Darmstadt)
Mikroskope	Binokular-Mikroskop Standard KF2 (Carl Zeiss, Jena) Inverses Mikroskop Axiovert 25 (Carl Zeiss, Jena) Inverses Mikroskop CKX41 (Olympus, Hamburg)
MTP-Reader	FLUOStar Galaxy (BMG Labtechnologie, Offenburg) HTS 7000 BioAssay Reader (Perkin Elmer GmbH, Überlingen) SpectraFluor Plus (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz)
PCR-Cycler	Primus 96 advanced (Pqrlab, Erlangen)
pH-Meter	pH-Meter pH 526 MultiCal® (WTW, Weilheim)
Sterile Werkbank (LAF)	HeraSafe KS15 (Kendro, Langenselbold)
UV/VIS-Photometer	BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg)
Wasseraufbereitung	Seradest SD 2800 (SERAL Reinstwassersysteme, Ransbach-Baumbach)
Western-Blot-Modul	XCell II™ Blot Modul (Invitrogen, Karlsruhe)
Zentrifugalevaporator	Concentrator 5301 (Eppendorf, Hamburg)
Zentrifugalmühle	ZM 1 und ZM 100 (Retsch, Haan)
Zentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5415 D (Eppendorf, Hamburg)

Zentrifugen	Biofuge Pico (Heraeus, Osterode)
	Labofuge 400R (Heraeus, Osterode)
	Multifuge 1 L-R (Heraeus, Osterode)
	Megafuge 1.0R (Heraeus, Osterode)

3.1.2. Verbrauchsmaterialien

Filter Minisart RC 25, Porengröße 0,2 µm	Sartorius AG, Göttingen
MTP 6well, PS, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
MTP 24well, PS, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
MTP 96well, PS, F-Boden, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
MTP 96well, PS, F-Boden, unsteril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
PP-Röhrchen (15 und 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
PVDF-Transfermembran (0,45 µm)	Pierce, Bonn
Reaktionsgefäße verschiedener Größen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
	Brand GmbH, Wertheim
	Eppendorf, Hamburg
Rotilabo® Spritzenfilter, steril, PES, 0,22 µm	Roth, Karlsruhe
Sterile Einfrierröhrchen Cryo.s™ (2 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Sterile Einmalpipetten (2, 5, 10, 25 und 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Sterile Einmalspritzen (2, 5, 10 und 20 ml)	Braun, Melsungen
Sterile Injektionskanülen (20 G, 23 G, 27 G)	Braun, Melsungen
UV-Küvetten mikro	Brand GmbH, Wertheim
Zellkulturflaschen, steril, PS, 25/75/175cm ²	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

3.1.3. Stationäre Phasen

Sephadex™ LH-20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>Dünnschichtchromatographie</i>	
Kieselgel 60 F ₂₅₄ , DC-Aluminiumfolie	Merck, Darmstadt
Kieselgel RP-60 F ₂₅₄ , DC-Aluminiumfolie	Merck, Darmstadt
<i>Semipräparative HPLC-Säule</i>	
Eurospher-100 C18 7 µm	Knauer GmbH, Berlin
(Ø = 16 mm, h = 260 mm)	

3.1.4. Chemikalien und Pufferlösungen

Die verwendeten Chemikalien und Biochemikalien wurden von den Firmen Calbiochem (Darmstadt), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), VWR (Darmstadt) in der jeweiligen höchsten

Qualität, mindestens in p. a. Qualität, bezogen. Im Folgenden sind nur spezielle Chemikalien und Biochemikalien aufgeführt, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.

Chemikalie	Bezugsquelle	Bestellnummer
AEBSF Hydrochlorid	Molekula	M41447139
Aprotinin	Roth	A162.1
Agarose Broad Range Roti®garose	Roth, Karlsruhe	6352.4
Ammoniumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe	T871.2
Ampicillin Natriumsalz	Roth, Karlsruhe	K029.3
BSA – Albumin Fraktion V	Roth, Karlsruhe	8076.3
Cryo-SFM Einfriermedium	PromoCell, Heidelberg	C-29912
Dexamethason	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	D-1756
DMSO	Roth, Karlsruhe	A994.1
dNTP-Mix (25 mM each)	Roth, Karlsruhe	K039.1
ECL-Substrat	Pierce, Bonn	34079
Fötales Kälberserum (FKS)	Hyclone, Fisher Scientific, Bonn	Ch. CSJ0417 Ch. RSJ30856
G418	Roth, Karlsruhe Biochrome, Berlin	0239.3 A271-25
Glutathion Sepharose 4B	GE Healthcare, Freiburg	17-0756-01
Glycin	Roth, Karlsruhe	3908.3
L-Glutaminsäure	Merck, Darmstadt	1002910250
Hygromycin-B-Lösung (50 mg/ml)	Roth, Karlsruhe	CP12.1
Kanamycinsulfat	Roth, Karlsruhe	T832.2
Ketaminhydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	K-2753
Leupeptin Hemisulfat	Roth, Karlsruhe	CN33.3
MEM (ohne Phenolrot)	Invitrogen Gibco™, Karlsruhe	51200-087
MEM (mit Earle's Salts)	PAA, Pasching, Österreich	E15-825
(+)-MK-801-Maleat	Calbiochem, Darmstadt	Cat. 475878
MTT (Thiazolylblau)	Roth, Karlsruhe	4022.2
Memantinhydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	M-9292
Natriumpyruvat, für Zellkultur	Invitrogen Gibco™, Karlsruhe	11840-030
Ni-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden	1018240
Nonidet (Igepal® CA-630)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	I3021
PBS	Biochrome, Berlin	L182-10
Penicillin/Streptomycin-Lösung	PAA, Pasching, Österreich	P11-010
PMSF	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	P-7626
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth, Karlsruhe	9090.4
Triton® X-100	Ferak Berlin GmbH, Berlin	505002
Trypsin-EDTA-Lösung	PAA, Pasching, Österreich	L11-003

Pufferlösungen, Stammlösungen

Annealingpuffer (Mutagenese)	100 mM Tris; 250 mM NaCl; pH 8,0
Blockierungspuffer (Western-Blot)	5 % (m/V) Milchpulver oder BSA in TBS/T
Coomassie-Entfärbelösung	5 % (V/V) MeOH; 5 % (V/V) Essigsäure
Coomassie-Färbelösung	45 % (V/V) MeOH; 10 % (V/V) Essigsäure; 0,2 % (m/V) Coomassie Brilliantblau G250
Dexamethason-SL	4 mM in DMSO gelöst
Elongationspuffer	100 mM MgCl ₂ ; 10 mM ATP; 10 mM DTT
G418-SL	200 mg/ml in PBS-Puffer, steril filtriert
G/G-SL	10 µM L-Glutaminsäure, 10 µM Glycin in phenolrotfreiem MEM, steril
L-Glutaminsäure-SL	1,8 mM in phenolrotfreiem MEM, steril filtriert
Glycin-SL	30 mM in phenolrotfreiem MEM, steril filtriert
Ketamin-SL	100 mM in PBS-Puffer, steril filtriert
Kinasepuffer	70 mM Tris; 10 mM MgCl ₂ ; 5 mM DTT; pH 7,6
Laemmli-Laufpuffer (SDS-PAGE)	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % (m/V) SDS; pH 8,6
Laemmli-Probenpuffer (2x)	125 mM Tris; 4 % (m/V) SDS; 20% (V/V) Glycerin; 10 % (V/V) 2-Mercaptoethanol; 0,004 % (m/V) Bromphenolblau; pH 6,8
MTT-SL	5 mg/ml MTT in PBS-Puffer, steril filtriert
Proteaseinhibitoren-SL	100 mM AEBSF; 0,154 mM Aprotinin; 10 mM Leupeptin; 0,1 M PMSF; 1 M DTT in MQ-Wasser
RIPA-Lysepuffer	50 mM Tris; 150 mM NaCl; 1 mM EGTA; 1 % (V/V) IGEPAL; 0,1 % (m/V) SDS; 1 µM Leupeptin; 1 µM Aprotinin; 1 mM AEBSF; pH 7,4
Sammelgel (10x) (SDS-PAGE)	1,25 M Tris; 0,4 % (m/V) SDS; pH 6,8; (3-4 % Acrylamid)
Stripping-Puffer	60 mM Tris; 2 % (m/V) SDS; 0,8 % (V/V) 2-Mercaptoethanol; pH 6,8
Taq-Reaktionspuffer (PCR)	50 mM KCl; 10 mM Tris; 15 mM Mg ²⁺ ; pH 8,3
TBE-Puffer	90 mM Tris; 90 mM Borsäure; 2 mM EDTA; pH 8,0
TBS	20 mM Tris; 137 mM NaCl; pH 7,4
TBS/T	0,1 % (V/V) Tween® 20 in TBS
TE-Puffer	10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 8,0
low-TE-Puffer	10 mM Tris; 0,1 mM EDTA; pH 8,0
Transferpuffer (Western-Blot)	25 mM Tris; 193 mM Glycin; 20 % (V/V) MeOH
Trenngel (10x) (SDS-PAGE)	1,5 M Tris; 0,4 % (m/V) SDS; pH 8,8; (7-13 % Acrylamid)

3.1.5. Verwendete Enzyme und Reaktions-Kits

Alle Enzyme und Reaktions-Kits wurden nach Angaben der jeweiligen Hersteller verwendet.

DNeasy® Plant Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
DNeasy® Tissue Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Plasmid Midi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Qiaquick® Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Qiaquick® PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Eppendorf® TripleMaster® PCR System	Eppendorf AG, Hamburg
5PRIME Taq DNA Polymerase Mix	5PRIME GmbH, Hamburg
Cytotoxicity Detection Kit®	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
T4 DNA Ligase (400 U/μl)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
T4 Polynukleotidkinase (10 U/μl)	NEB GmbH, Frankfurt am Main
T7 DNA Polymerase (<i>unmodified</i> , 10 U/μl)	NEB GmbH, Frankfurt am Main
PreScission Protease	GE Healthcare, Freiburg
Proteinase K (900 U/μl)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Lysozym (20.000 U/mg)	Roth GmbH, Karlsruhe
Restriktionsenzyme (4-100 U/μl)	NEB GmbH, Frankfurt am Main

3.1.6. Verwendete Lösungsmittel und Gase

Alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Lösungsmittel (für Extraktionen und analytische Verfahren) entsprachen p. a.-Qualität und wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und VWR (Darmstadt) bezogen. Für Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) wurden Lösungsmittel in geeigneter Qualität von den Firmen Roth (Karlsruhe) und VWR (Darmstadt) verwendet.

Die verwendeten Gase Kohlendioxid und Stickstoff wurden in der Qualität für technische Zwecke von der Firma Linde (Wiesbaden) bezogen.

3.1.7. Medienzusammensetzung für Mikroorganismen

Folgende Medien wurden für die Anzucht von Mikroorganismen verwendet. Die Medienbestandteile wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Merck (Darmstadt), SERVA (Heidelberg) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

LB-Medium für E. coli

10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Bacto-Hefeextrakt; 10 g/l NaCl; (15 g/l Agar-Agar); pH 7,0 (steril durch Autoklavieren)

SOC-Medium für Transformation

10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Bacto-Hefeextrakt; 0,1 % (m/V) Glucose (steril durch Autoklavieren)

*YPD-Vollmedium für *S. cerevisiae**

20 g/l Bacto-Pepton; 10 g/l Hefeextrakt; 20 g/l Glucose; (18 g/l Agar-Agar); pH 6,5; (steril durch Autoklavieren)

*YNB-Minimalmedium/Selektionsmedium mit Glucose für *S. cerevisiae**

0,67 g/l Yeast Nitrogen Base (ohne Aminosäuren); (18 g/l Agar-Agar); nach Autoklavieren Zugabe von 0,2 g/l Glucose und jeweils 20 mg/l L-Tryptophan; L-Histidin und L-Leucin

*YNB-Medium mit Galactose für *S. cerevisiae**

0,67 g/l Yeast Nitrogen Base (ohne Aminosäuren); nach Autoklavieren Zugabe von 30 g/l Galactose und jeweils 20 mg/l L-Tryptophan; L-Histidin und L-Leucin

*Fermentationsmedium für *S. cerevisiae*, nach Ausubel et al. 2002*

1,7 g/l Yeast Nitrogen Base (ohne Aminosäuren); 5 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; nach Autoklavieren Zugabe von 20 g/l Glucose bzw. für Induktion 30 g/l Galactose; 40 mg/l Adenin; 20 mg/l L-Arginin; 100 mg/l L-Asparaginsäure; 100 mg/l L-Glutaminsäure; 20 mg/l L-Histidin; 60 mg/l L-Leucin; 30 mg/l L-Lysin; 20 mg/l L-Methionin; 50 mg/l L-Phenylalanin; 375 mg/l L-Serin; 200 mg/l L-Threonin; 40 mg/l L-Tryptophan; 30 mg/l L-Tyrosin; 150 mg/l L-Valin; 20 mg/l Uracil

3.1.8. Medienzusammensetzung für Zellkultur

Medium für L(tk-)-Zellen

MEM mit Earle's Salts, mit Phenolrotzusatz und L-Glutamin, 10 % (V/V) FKS, 1 % (V/V) Penicillin/Streptomycin, 50 mM Natriumpyruvat

Medium für L12-10- und L13-E6-Zellen

MEM mit Earle's Salts, mit Phenolrotzusatz und L-Glutamin, 10 % (V/V) FKS, 1 % (V/V) Penicillin/Streptomycin, 50 mM Natriumpyruvat, 100 µM Ketamin und 800 µg/ml G418 zur Selektion

Medium für SH-SY5Y Zellen

DMEM mit Phenolrotzusatz, mit stabilem L-Glutamin, 4,5 g/l Glucose, 10 (V/V) % FKS, 1 % (V/V) Penicillin/Streptomycin

3.1.9. Verwendete Primer

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden bezogen von den Firmen Eurofins MWG Operon (Martinsried), Biomers.net (Ulm) und Metabion (Martinsried). Die gefriergetrockneten Oligonukleotide wurden entsprechend den Angaben der Hersteller mit MQ-Wasser zu 100 pmol/µl verdünnt. Die Sequenzen der Primer sind in 5' → 3' Richtung dargestellt.

Bezeichnung	Sequenz	Bemerkung
ApoE3-2	GCA TGT CGA CTC AGT GAT TGT CGC T	Klonierung
ApoE5-3	GCT CTA GAC ATG AAG GTT CTG TGG G	Klonierung
Ker010-F	GTT TCC GTA GGT GAA CCT GC	ITS
Ker012-R	CTG ACC TGG GGT CGC	ITS
Mut2-ApoE4rev	CCA GGC GGC CGC GCA CGT CCT CC	Einzelstrangmutagenese

3.1.10. Verwendete Vektoren

Die nachfolgende Liste enthält alle Vektoren, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden. Die in eckigen Klammern angegebene interne Datenbanknummer bezieht sich auf die Datenbank des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie, Institut für Pharmazie der Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Bezeichnung	Merkmale, Referenz
pEGKT	[25000]; 10.000 bp; CYC1-Promotor; GAL-1-10 UAS; <i>ura3</i> ; Ori; 2 μ ; <i>leu2-d</i> ; f1-Ori; GST-Tag (N-terminal); Thrombin-Protease-Schnittstelle; β -Lactamase-Gen (Amp^r); (Mitchell <i>et al.</i> 1993)
pGEX-5T	[11587]; 4999 bp; <i>tac</i> -Promotor; <i>lac</i> -Operator; <i>LacI</i> ^q ; GST-Tag (N-terminal); His-Tag (N-terminal); Thrombin-Protease-Schnittstelle; β -Lactamase-Gen (Amp^r); (Berthold <i>et al.</i> 1992)
pGEX-6P-1	[25012]; 4984 bp; <i>tac</i> -Promotor; <i>lac</i> -Operator; <i>LacI</i> ^q ; GST-Tag (N-terminal); PreScission-Protease-Schnittstelle; β -Lactamase-Gen (Amp^r); Amersham, (27-4597-01); <i>GenBank</i> [®] U78872.1
pOTB7ApoE3	[25002]; 3001 bp; SP6-, T7-Promotor; pUC Ori; M13u; Chloramphenicol Acetyltransferase (Cam^r); Insert: humane cDNA <i>APOE</i> ϵ 3; Clone ID: IRAUp969B0212D6 (RZPD, Berlin)

3.1.11. Hergestellte Vektorkonstrukte mit Insert

Die in eckigen Klammern angegebene interne Datenbanknummer bezieht sich auf die Datenbank des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie, Institut für Pharmazie der Friedrich-Schiller-Universität Jena. Vektorkarten sind dem Anhang beigelegt.

Bezeichnung	Merkmale
pEGKTApoE3C	[25006]; 10.983 bp, Hefeexpressionsvektor; GST-Tag (N-terminal); Thrombin-Protease-Schnittstelle; Insert Apolipoprotein E3 als PCR- Produkt (Primer: ApoE5-3; ApoE3-2) mit <i>XbaI</i> - und <i>SalI</i> -Schnittstellen in den Ausgangsvektor pEGKT [25000] kloniert

Bezeichnung	Merkmale
pEGKTApoE4C	[25007]; 10.983 bp; Hefeexpressionsvektor; GST-Tag (N-terminal); Thrombin-Protease-Schnittstelle; Insert Apolipoprotein E4; Einzelstrangmutagenese mit Mut2-ApoE4rev-Primer an Vektor pEGKTApoE3C [25006]; Punktmutation (T gegen C) an Position 388
pGEX-5TApoE3	[25008]; 5949 bp; GST-Tag (N-terminal); His-Tag (N-terminal); Thrombin-Protease-Schnittstelle; Insert Apolipoprotein E3 als <i>Bam</i> H1- und <i>Sall</i> -Fragment aus Vektor pEGKTApoE3C [25006] kloniert
pGEX-5TApoE4	[25009]; 5949 bp; GST-Tag (N-terminal); PreScission-Protease-Schnittstelle; Insert Apolipoprotein E4 als <i>Bam</i> H1- und <i>Sall</i> -Fragment aus Vektor pEGKTApoE4C [25007] kloniert
pGEX-6P-1ApoE3	[25010]; 5871 bp; GST-Tag (N-terminal); PreScission-Protease-Schnittstelle; Insert Apolipoprotein E3 als <i>Bam</i> H1- und <i>Sall</i> -Fragment aus Vektor pGEX-5TApoE3 [25008] kloniert
pGEX-6P-1ApoE4	[25011]; 5871 bp; GST-Tag (N-terminal); PreScission-Protease-Schnittstelle; Insert Apolipoprotein E4 als <i>Bam</i> H1- und <i>Sall</i> -Fragment aus Vektor pGEX-5TApoE4 [25009] kloniert

3.1.12. Verwendete Antikörper

Anti β -Actin (C4) (sc-47778 Santa Cruz Biotechnology, Inc.)

Primärer monoklonaler Antikörper, Herkunft: Maus, zur Detektion von β -Actin, Erzeuger: Santa Cruz Biotechnology Inc., Katalognummer: sc-47778, Verwendung im Western-Blot 1:1000 mit 5 % (m/V) Milchpulver in TBS/T-Lösung.

Anti-Apolipoprotein E (178479 Calbiochem)

Primärer polyklonaler Antikörper, Herkunft: Ziege, zur Detektion von Apolipoprotein E, Erzeuger: Calbiochem, Katalognummer: 178479-500UL, über Merck4Biosciences Deutschland bezogen. Verwendung im Western-Blot 1:1000 mit 5 % (m/V) Milchpulver in TBS/T-Lösung.

Anti-Apolipoprotein E (178479 Calbiochem)

Primärer monoklonaler Antikörper, Herkunft: Maus, zur Detektion von Apolipoprotein E (AS 158), Erzeuger: Calbiochem, Katalognummer: 178479 (NE1004), über Merck4Biosciences Deutschland bezogen. Verwendung im Western-Blot 1:1000 mit 5 % (m/V) Milchpulver in TBS/T-Lösung.

Anti-GST Antikörper (#2622 Cell Signaling)

Primärer polyklonaler Antikörper, Herkunft: Kaninchen, zur Detektion von GST-Fusion-Proteinen, Erzeuger: Cell Signaling, Katalognummer: #2622, über NEB GmbH bezogen. Verwendung im Western-Blot 1:1000 mit 5 % (m/V) Milchpulver in TBS/T-Lösung.

Anti-Maus IgG, HRP-gekoppelter Antikörper (#7076 Cell Signaling)

Sekundärer HRP-gekoppelter Antikörper, Herkunft: Pferd, zur Detektion von murinen primären Antikörpern, Erzeuger: Cell Signaling, Katalognummer: #7076, über NEB GmbH bezogen. Verwendung im Western-Blot 1:2000 mit 5 % (m/V) Milchpulver in TBS/T-Lösung.

Anti-Kaninchen IgG, HRP-gekoppelter Antikörper (#7074 Cell Signaling)

Sekundärer HRP-gekoppelter Antikörper, Herkunft: Ziege, zur Detektion von primären Antikörpern, die in Kaninchen erzeugt wurden, Erzeuger: Cell Signaling, Katalognummer: #7074, über NEB GmbH bezogen. Verwendung im Western-Blot 1:2000 mit 5 % (m/V) Milchpulver in TBS/T-Lösung.

Anti-Maus IgG, HRP-gekoppelter Antikörper (#7076 Cell Signaling)

Sekundärer HRP-gekoppelter Antikörper, Herkunft: Pferd, zur Detektion von murinen primären Antikörpern, Erzeuger: Cell Signaling, Katalognummer: #7076, über NEB GmbH bezogen. Verwendung im Western-Blot 1:2000 mit 5 % (m/V) Milchpulver in TBS/T-Lösung.

Anti-NMDAR1 (556308 BD Pharming)

Primärer polyklonaler Antikörper, Herkunft: Maus, zur Detektion des NMDA-NR1-UE (AS 660-811), Erzeuger: BD Pharming, Katalognummer: 556308, über BD Bioscience Europe bezogen. Verwendung im Western-Blot 1:2000 mit 5 % (m/V) BSA in TBS/T-Lösung.

Anti-Ziege IgG, HRP-gekoppelter Antikörper (sc-2768 Santa Cruz Biotechnology Inc.)

Sekundärer HRP-gekoppelter Antikörper, Herkunft: Kaninchen, zur Detektion von primären Antikörpern, die in Ziegen erzeugt wurden, Erzeuger: Santa Cruz Biotechnology, Inc., Katalognummer: sc-2768, Verwendung im Western-Blot 1:5000 in 5 % (m/V) Milchpulver in TBS/T-Lösung.

3.1.13. Verwendete Expressions- und Klonierungsstämme sowie Phagen

Stamm	Genotyp
BI21 (DE3)	<i>Escherichia coli</i> , F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> (DE3); bezogen von Novagen® (69449) (Phillips <i>et al.</i> 1984)
DH5α	<i>Escherichia coli</i> ; F ⁻ , <i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> , ϕ80 <i>lacZ</i> ΔM15, <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> ; bezogen von Invitrogen, Karlsruhe (Hanahan 1983, Sambrook und Russell 2001)
JM109	<i>Escherichia coli</i> ; <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , λ ⁻ , Δ(<i>lac-proAB</i>); bezogen von NEB, Frankfurt (Yanisch-Perron <i>et al.</i> 1985)
RZ1032	<i>Escherichia coli</i> ; F ⁻ , cat, (pCJ105; m13s, CMR) <i>dut-1</i> , <i>ung-1</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> , <i>spoT1</i> , <i>mcrA</i>
INVSc1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; <i>MATa</i> , <i>his3D1</i> , <i>leu2</i> , <i>trp1-289</i> , <i>ura3-52</i> ; bezogen von Invitrogen, Karlsruhe (Nr. C810-00) (Osakabe <i>et al.</i> 1999)
M13K07	Bakteriophage; M13, Gen II von M13mp1, pM15A Ori, Tn903 Kanamycin-Resistenz (Vieira und Messing 1987)

3.1.14. Verwendete Zelllinien

Murine Fibroblastenzelllinie L(tk-) (ECACC 85011432)

Zellen der murinen Fibroblastenzelllinie L(tk-) wurden bezogen von der *European Collection of Cell Cultures* (ECACC, Salisbury, UK). Es handelt sich dabei um eine Subzelllinie, die aus der L-M-Zelllinie (ECACC 87032401) hervorgegangen ist. Die Zellen sind 5-Bromo-2'-Deoxyuridin resistent, Thymidinkinase (TK)-defizient und wachsen nicht in HAT-Medium (Kit *et al.* 1963).

Murine Fibroblastenzelllinien L12-G10 und L13-E6

Die Messung der inhibitorischen Aktivität am NMDA-Rezeptor erfolgte in den Zelllinien L12-G10 und L13-E6. Diese wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Dieter Steinhilber (Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt am Main) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich dabei um Subzelllinien, die ursprünglich aus L(tk-)-Zellen hervorgegangen sind. Diese exprimieren humane cDNAs der Untereinheiten NR1-1a/NR2A (L12-G10) und NR1-1a/NR2B (L13-E6) des NMDA-Rezeptors. Die Regulation der Rezeptor-Expression erfolgt durch Zugabe von Dexamethason und wird über ein *glucocorticoid responsive element* vermittelt. Außerdem besitzen die Zellen eine G418-Resistenz zur Selektion (Steinmetz *et al.* 2002).

Humane Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y (ATCC CRL-2266)

Die Zellen der humanen Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y wurden dankend von Dr. Larissa Pusch (Institut für Anatomie, Friedrich-Schiller-Universität Jena) erhalten und waren ursprünglich von der *American Type Culture Collection* (ATCC, Mannassa, VA, USA) bezogen worden. Bei der Zelllinie handelt es sich um eine Subzelllinie der dritten Generation, die aus der Ursprungszelllinie SK-N-SH hervorgegangen ist (Biedler *et al.* 1973). Charakteristisch für SH-SY5Y ist eine moderate Dopamin- β -Hydroxylase-Aktivität (Biedler *et al.* 1978).

3.1.15. Drogenmaterial, Extrakte und Testsubstanzen

Drogen aus der Traditionellen Chinesischen Medizin

Alle verwendeten Drogen der Traditionellen Chinesischen Medizin (TCM) sind in Tabelle 3 mit Angabe des Lieferanten und der Chargennummer aufgeführt.

Pipturus argenteus WEDD.

In der vorliegenden Arbeit wurde getrocknetes Pflanzenmaterial (innere Rinde, Voucher-Nummer: 2766-1.9) von *Pipturus argenteus* WEDD. freundlicherweise von Prof. Dr. Jörg Heilmann (Institut für Pharmazie, Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Universität Regensburg) zur Verfügung gestellt. Das Drogenmaterial war Bestandteil einer Wildsammlung aus dem Jahre 2006, die aus dem Inselstaat Vanuatu stammt. Die botanische, makroskopische Identitätsprüfung erfolgte durch den Royal Botanic Garden (Kew, London, Großbritannien) (Bradacs 2008a).

Getestete Substanzen und Extrakte

Die in Tabelle 4 gelisteten Substanzen wurden dankend vom Arbeitskreis von Prof. Dr. Jochen Lehmann (Institut für Pharmazie, Lehrstuhl Pharmazeutische Chemie, Friedrich-Schiller- Universität Jena), von Prof. Dr. Jörg Heilmann (Institut für Pharmazie, Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Universität Regensburg) und Prof. Dr. Bernhard Wünsch (Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Universität Münster) zur Verfügung gestellt. Die Verbindungen **5**, **5a**, **5b** und **5c** wurden von Dr. Christoph Enzensperger (Institut für Pharmazie, Lehrstuhl Pharmazeutische Chemie, Friedrich-Schiller-Universität Jena) synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Strukturformeln der jeweiligen Substanzen sind im Anhang abgebildet.

Die in Tabelle 5 dargestellten TCM-Extrakte wurden am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena, selbst hergestellt. Extrakte von Pflanzen der Vanuatu-Wildsammlung wurden von Prof. Dr. Jörg Heilmann (Institut für Pharmazie, Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Universität Regensburg) erhalten. Die internen Nummern dieser Extrakte (Tabelle 5) entsprechen der jeweiligen Voucher-Nummer der Pflanze (Bradacs 2008a). Die verwendeten Extrakte wurden zu 50 mg/ml in DMSO aufgenommen. TCM-Extrakte (Auszugsmittel Wasser) wurden zu 5 mg/ml in Wasser gelöst.

Tabelle 3 | Untersuchte kommerziell erworbene TCM-Drogen

Droge	Stammpflanze	Lieferant	Charge
Arisaematis rhizoma	<i>Arisaema consanguineum</i>	Herbasin Hilsdorf GmbH, Rednitzhembach	030601H116
Coptidis rhizoma	<i>Coptis chinensis</i>	Herbasin Hilsdorf GmbH, Rednitzhembach	040801H053
Curcumae longae tuber	<i>Curcuma longa</i>	Herbasin Hilsdorf GmbH, Rednitzhembach	040801H056
Cynomorii herba	<i>Cynomorium songaricum</i>	Herbasin Hilsdorf GmbH, Rednitzhembach	040801H349
Drynariae rhizoma	<i>Drynaria fortunei</i>	Kräuter Schulte, Gernsbach Schwarzwald	15569
Gardeniae fructus	<i>Gardenia jasminoides</i>	Herbasin Hilsdorf GmbH, Rednitzhembach	051101H061
Gleditsiae fructus	<i>Gleditsia sinensis</i>	Kräuter Schulte, Gernsbach Schwarzwald	15570
Polygonati rhizoma	<i>Polygonatum sibiricum</i>	Herbasin Hilsdorf GmbH, Rednitzhembach	050501H152
Sappan lignum	<i>Caesalpinia sappan</i>	Kräuter Schulte, Gernsbach Schwarzwald	21965
Scutellariae radix	<i>Scutellaria baicalensis</i>	Herbasin Hilsdorf GmbH, Rednitzhembach	070201H089
Sophorae (flavescentis) radix	<i>Sophora flavescens</i>	Herbasin Hilsdorf GmbH, Rednitzhembach	050801H092

Tabelle 4 | Untersuchte Reinsubstanzen

(AK – Arbeitskreis, SL – Stammlösung, LM – Lösungsmittel, β -CD – β -Carbolin-Derivate, FID – Flurbiprofen-Derivate, TD – Tacrin-Derivate, 3-BD – 3-Benzazepin-Derivate)

Nummer	c _{SL} (LM)	Quelle	Nummer	c _{SL} (LM)	Quelle
1 (Ketamin)	100 mM (PBS)	AK Winckler	11 (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann
2 (Memantin)	10 mM (PBS)	AK Winckler	12 (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann
3 (Mk-801)	30 μ M (PBS)	AK Winckler	13 (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann
4a (Spermidin)	100 mM (DMSO)	AK Winckler	14 (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann
4b (Spermin)	100 mM (DMSO)	AK Winckler	14a (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann
5 (PCA)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann	15 (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann
5a (PCE)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann	15a (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann
5b (PCOH)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann	15b (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann
5c (PCOE)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann	15c (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann
6 (Norharman)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann	15d (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann
6a (Harman)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann	15e (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann
6b (Harmin)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann	15f (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann
6c (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann	15g (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann
6d (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann	15h (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann
6e (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann	15i (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann
7 (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann	15j (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann
7a (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann	16 (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann
7b (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann	17 (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann
7c (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann	18 (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann
7d (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann	19 (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann
8 (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann	20 (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann
8a (Harmalin)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann	21 (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann
9 (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann	22 (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann
9a (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann	22a (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann
9b (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann	23 (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann
9c (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann	23a (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann
9d (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann	23b (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann
10 (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann	24 (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann
10a (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann	24a (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann
10b (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann	24b (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann
10c (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann	25 (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann
10d (β -CD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann	26 (3-BD)	10 mM (DMSO)	AK Wünsch

Fortsetzung Tabelle 4 | Untersuchte Reinsubstanzen

(AK – Arbeitskreis, SL – Stammlösung, LM – Lösungsmittel, β -CD – β -Carbolin-Derivate, FID – Flurbiprofen-Derivate, TD – Tacrin-Derivate, 3-BD – 3-Benzazepin-Derivate)

Nummer	c _{SL} (LM)	Quelle	Nummer	c _{SL} (LM)	Quelle
26a (3-BD)	10 mM (DMSO)	AK Wünsch	33a	100 mM (DMSO)	AK Lehmann
26b (3-BD)	10 mM (DMSO)	AK Wünsch	33b	100 mM (DMSO)	AK Lehmann
27 (Flurbiprofen)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann	33c	100 mM (DMSO)	AK Lehmann
27a (FID)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann	34	100 mM (DMSO)	AK Lehmann
27b (FID)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann	34a	100 mM (DMSO)	AK Lehmann
27c (FID)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann	34b	100 mM (DMSO)	AK Lehmann
27d (FID)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann	35	100 mM (DMSO)	AK Lehmann
27e (FID)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann	36	100 mM (DMSO)	AK Lehmann
27f (FID)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann	36a	100 mM (DMSO)	AK Lehmann
27g (FID)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann	36b	100 mM (DMSO)	AK Lehmann
27h (FID)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann	37 (Galantamin)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann
27i (FID)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann	38 (Huperzin A)	100 mM (DMSO)	AK Heilmann
28 (Tacrin)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann	39 (Rivastigmin)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann
28a (TD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann	40 (Nifedipin)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann
28c (TD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann	41 (Verapamil)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann
28d (TD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann	42 ((+)-Catechin)	100 mM (DMSO)	AK Heilmann
28e (TD)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann	43 ((-)-Epicatechin)	100 mM (DMSO)	AK Heilmann
29 (Atorvastatin)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann	44 (Procyanidin B-1)	100 mM (DMSO)	AK Heilmann
30 (Lovastatin)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann	45 (Procyanidin B-3)	100 mM (DMSO)	AK Heilmann
31 (Pravastatin)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann	46 (Rutin)	100 mM (DMSO)	AK Winckler
32 (Simvastatin)	100 mM (DMSO)	AK Lehmann	47 (Ferulolytyramin)	100 mM (DMSO)	AK Heilmann
33	100 mM (DMSO)	AK Lehmann	48 (Loliolid)	100 mM (DMSO)	AK Heilmann

Tabelle 5 | Verwendete Pflanzenextrakte

Pflanze (Familie)	Pflanzenteil	Nr.	Auszugsmittel
<i>Arisaema erubescens</i> (WALL.) SCHOTT (Araceae)	Wurzelstock	TCM 1	Wasser, MeOH
<i>Caesalpinia sapan</i> L. (Caesalpinaceae)	Rinde	TCM 5	Wasser, MeOH
<i>Coptis chinensis</i> FRANCH. (Ranunculaceae)	Wurzelstock	TCM 8	Wasser, MeOH
<i>Curcuma wenyujin</i> Y. H. CHEN ET C. LING. (Zingiberaceae)	Wurzelknolle	TCM 2	Wasser, MeOH
<i>Cynomorium songaricum</i> RUPR. (Cynomoriaceae)	Kraut	TCM 7	Wasser, MeOH
<i>Drynaria fortunei</i> (KUNZE) J. SM. (Polypodiaceae)	Wurzelstock	TCM 3	Wasser, MeOH
<i>Gardenia jasminoides</i> Ellis (Rubiaceae)	Frucht	TCM 10	Wasser, MeOH
<i>Gleditsia sinensis</i> LAM. (Fabaceae)	Frucht	TCM 4	Wasser, MeOH
<i>Polygonatum sibiricum</i> RED. (Liliaceae)	Wurzelstock	TCM 6	Wasser, MeOH
<i>Scutellaria baicalensis</i> GEORGI (Lamiaceae)	Wurzel	TCM 9	Wasser, MeOH
<i>Sophora flavescens</i> AIT. (Fabaceae)	Wurzel	TCM 11	Wasser, MeOH
<i>Acalypha grandis</i> BENTH. (Euphorbiaceae)	Blätter	2766-1.1	DCM, EtOAc, MeOH
<i>Aidia racemosa</i> (CAV.) D. D. TIRVENG. (Rubiaceae)	Blätter	0476-1.2	DCM, EtOAc, MeOH
<i>Allophylus timoriensis</i> DC. BL. (Sapindaceae)	Blätter	0476-1.5	DCM, EtOAc, MeOH
<i>Baccaurea stylaris</i> MUELL. ARG. (Phyllanthaceae)	Blätter	1786-6F	DCM, EtOAc, MeOH
<i>Baccaurea stylaris</i> MUELL. ARG. (Phyllanthaceae)	innere Rinde	1786-6C	DCM, EtOAc, MeOH
<i>Bidens pilosa</i> L. (Asteraceae)	Blätter	1686-1.2	DCM, EtOAc, MeOH
<i>Dracontomelon vitiense</i> ENGL. (Anacardiaceae)	innere Rinde	0186-12	DCM, EtOAc, MeOH
<i>Dysoxylum arborescens</i> (BL.) MIQ. (Meliaceae)	Blätter	0476-1.6	DCM, EtOAc, MeOH
<i>Euodia latifolia</i> DC. (Rutaceae)	Blätter	0276-1	DCM, EtOAc, MeOH
<i>Grewia inmac</i> GUILL. (Sparrmanniaceae)	Blätter	1686-1.13	DCM, EtOAc, MeOH
<i>Gyrocapus americanus</i> JACQ. (Hernandiaceae)	Blätter	0476-2.1	DCM, EtOAc, MeOH
<i>Intsia bijuga</i> (COLEBR.) O. KTZE. (Fabaceae)	Blätter	2176-1	DCM, EtOAc, MeOH
<i>Macaranga dioica</i> MUELL. ARG. (Euphorbiaceae)	Blätter	2176-7L2F	DCM, EtOAc, MeOH
<i>Macaranga dioica</i> MUELL. ARG. (Euphorbiaceae)	innere Rinde	2176-7L2C	DCM, EtOAc, MeOH
<i>Macaranga tanarius</i> (L.) MUELL. ARG. (Euphorbiaceae)	Blätter	2176-7L1	DCM, EtOAc, MeOH
<i>Macropiper latifolium</i> (L. F.) (Piperaceae)	Stamm	2176-10	DCM, EtOAc, MeOH
<i>Pipturus argenteus</i> WEDD. (Urticaceae)	innere Rinde	2766-1.9	DCM, EtOAc, MeOH
<i>Syzygium malaccense</i> (L.) MERR. & L. M. (Myrtaceae)	Blätter	3066-2	DCM, EtOAc, MeOH
<i>Tabernaemontana pandacaqui</i> LAM. (Apocynaceae)	Blätter	2966-2	DCM, EtOAc, MeOH
<i>Tabernaemontana pandacaqui</i> LAM. (Apocynaceae)	Blätter	2576-10	DCM, EtOAc, MeOH
<i>Zingiber zerumbet</i> (L.) SM. (Zingiberaceae)	Rhizom	2576-4	DCM, EtOAc, MeOH

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkultur

L(tk-), L12-G10 und L13-E6

Die Langzeitlagerung der Zellen erfolgte als Suspension in Einfriermedium (Cryo SFM) in flüssigem Stickstoff. Zur Kultivierung wurden Zellkonserven im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, sofort in einem 15 ml PP-Röhrchen mit 7 ml Kulturmedium (Kapitel 3.1.8.) versetzt und 5 min bei 600 x g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde danach abgesaugt, die Zellen in 1 ml Kulturmedium vorsichtig resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Die Kultivierung erfolgte in 15 ml Medium in einer 75cm²-Zellkulturflasche bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit in einem Zellinkubator. Die Zellen wurden in regelmäßigen Abständen auf Konfluenz und Aussehen überprüft. Gegebenenfalls wurde vor Erreichen der Konfluenz bei pH-Wert-Änderung (Farbumschlag) das Medium gewechselt. Bei erreichter Konfluenz wurden die Zellen subkultiviert („Zellen splitten“). Dafür wurden die Zellen nach Absaugen des verbrauchten Kulturmediums einmal mit 10 ml (bei 75cm²-Zellkulturflasche) PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung bei 37 °C für 5 min inkubiert. Zum vollständigen Ablösen der Zellen wurde die Kulturflasche leicht agitiert. Zur Inaktivierung der Trypsin-Aktivität erfolgte eine Zugabe von 5 ml Medium. Nach anschließender Zentrifugation bei 600 x g für 5 min wurden der Überstand entfernt und die Zellen in entsprechender Dichte (Verhältnis 1:4 bis 1:8) in frischem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche ausgesät. Eine Subkultivierung erfolgte dreimal wöchentlich. Zusätzlich wurden den Zelllinien L12-G10 und L13-E6 zur Selektion 800 µg/ml G418 und zur NMDA-Inhibition 100 µM Ketamin zugesetzt.

Für die Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff wurden Zellen mit niedriger Passagezahl wie oben beschrieben zentrifugiert und anschließend in Einfriermedium resuspendiert. Um die Zellen möglichst schonend zu behandeln, wurden die Kryoröhrchen in Zellstoff eingewickelt und aufrecht bei -80 °C für 12 h zwischengelagert. Erst dann erfolgte die Überführung in den Stickstoffbehälter.

SH-SY5Y

Die routinemäßige Kultivierung der SH-SY5Y-Zellen erfolgte analog zu den L(tk-)-Zellen. Für die zweimal wöchentliche Subkultivierung wurde DMEM-Medium (Kapitel 3.1.8.) verwendet.

3.2.2. Molekularbiologische Methoden

Alle verwendeten molekularbiologischen Standardmethoden für Klonierungen wurden nach Sambrook & Russell (2001) durchgeführt. Die Arbeiten umfassten Plasmidpräparationen, PCR, Restriktionsverdau von DNA, Ethanol- bzw. Isopropanolfällung, Transformation von Bakterien und Hefen sowie Agarose-Gel-Elektrophorese und PAA-Gel-Elektrophorese. Die dabei genutzten Enzyme und Reaktions-Kits wurden nach Angaben der jeweiligen Hersteller verwendet. Sequenzierungen von DNA-Abschnitten erfolgten durch die Firma Eurofins MWG Operon (Martinsried).

Einzelstrangmutagenese

Die Durchführung der Einzelstrangmutagenese orientierte sich an der Methode nach Kunkel (Kunkel 1985, Vieira und Messing 1987). Ziel der Einzelstrangmutagenese war es, gezielt eine Punktmutation im *APOE3*-Gen so einzuführen, dass der Basenaustausch eine Isoformänderung zu ApoE4 zur Folge hat. Voraussetzung für diese Methode ist das Vorhandensein eines Replikationsursprunges des Phagen f1 (f1-Ori) im Ausgangsplasmid. Für die Mutagenese wurde zunächst das Ausgangsplasmid pEGKTApoE3 in den *E.-coli*-Stamm RZ1032 transformiert. Dieser baut anstelle von Thymin Uracil in seine DNA ein. Somit werden alle dTTPs im Plasmid gegen dUTPs ausgetauscht. Einer der erhaltenen Klone wurde in 3 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) über Nacht bei 37 °C kultiviert (Vorkultur). Mit 1 ml der erhaltenen Zellsuspension wurde am nächsten Tag 50 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) beimpft und bei 37 °C und 200 U/min im Schüttler inkubiert. Bei ausreichender Zelldichte ($OD_{600} = 0,3$) wurden 100 µl einer Suspension des Helferphagen M13K07 zugegeben. Dieser synthetisiert aus dem uracilhaltigen Ausgangsplasmid einzelsträngige dU-DNA (ssU-DNA). Nach weiterer 60-minütiger Kultivierung erfolgte dann die Zugabe von 50 mg/ml Kanamycin zur Selektion. Die Kultur wurde weiterführend über Nacht inkubiert. Zur Isolierung einzelsträngiger DNA wurde die Kultursuspension auf zwei Corex®-Zentrifugenröhrchen verteilt und bei 6000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der phagenhaltige Überstand wurde vorsichtig mit einer Glaspipette abgenommen, nochmals zentrifugiert und mit 50 µl RNaseA (10 µg/ml) versetzt. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken. Zur Präzipitation der Phagen wurde der erhaltene Überstand im Verhältnis 4:1 mit einem Gemisch aus Ammoniumacetat (3,5 M) und Polyethylenglycol 8000 (20 % (m/V)) versetzt, für 30 min auf Eis belassen und erneut,

wie schon beschrieben, zentrifugiert. Nach der Fällung wurde der Überstand vorsichtig dekantiert, das Pellet in 400 µl low-TE resuspendiert und in ein mit 40 µl NaCl-Lösung (4 M) befülltes Reaktionsgefäß überführt. Die gewonnene DNA wurde zuerst zweimal mit einem Phenol-Chloroform-Gemisch und anschließend einmal in Ethanol gefällt. Der getrocknete Niederschlag wurde abschließend in 30 µl low-TE aufgenommen. Die Quantifizierung und Bestimmung der Reinheit der einzelsträngigen Uracil-haltigen Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe eines Photometers.

Zur Synthese der mutierten Plasmid-DNA wurde der benötigte Primer (Mut2-ApoE4rev), der die gewünschte Mutation für *APOE4* enthält, phosphoryliert und durch Ethanolfällung gereinigt. In Tabelle 6 sind die verwendeten Reaktionsansätze für Phosphorylierung- und Synthesereaktionen zusammengefasst dargestellt. Die Synthese der DNA erfolgte durch einen Annealing- und Elongationsschritt. Alle Pipettierschritte wurden auf Eis durchgeführt. Abschließend wurde der Ansatz mit Ethanol gefällt, in 50 µl MQ-Wasser aufgenommen und in *E. coli* DH5α durch Elektroporation transformiert. Die Überprüfung der Mutagenese erfolgte durch Sequenzierung.

Tabelle 6 | Pipettierschema für Reaktionen der Einzelstrangmutagenese

Primerphosphorylierung		Annealing		Elongation	
2 µl	Primer (100 pmol/µl)	2 µl	phos. Primer	20 µl	Annealing-Ansatz
2 µl	Kinasepuffer (10x)	4 µl	Annealingpuffer (5x)	4 µl	Elongationspuffer (10x)
1 µl	ATP (100 mM)	2 µl	ss-dU DNA (2 µg)	2 µl	dNTPs (25 mM)
0,5 µl	T4 Polynukleotidkinase (5U)	9 µl	MQ-Wasser	1 µl	T7 DNA-Polymerase (10 U)
15 µl	MQ-Wasser			3 µl	T4 DNA-Ligase (12 U)
				10 µl	MQ-Wasser
60 min 37 °C		4 min 100 °C, direkt auf Eis		5 min Eis, 5 min RT, 2 h 37 °C	

ITS-Sequenzanalyse zur molekularphylogenetischen Identitätsprüfung von *Pipturus argenteus*

In der vorliegenden Arbeit wurde mit getrocknetem Pflanzenmaterial von *P. argenteus* eine ITS-Sequenzanalyse zur molekularphylogenetischen Identitätsprüfung durchgeführt.

Im eukaryotischen Genom findet man mehrere Kopien von rRNA-Genen, die man für molekularphylogenetische Untersuchungen nutzt. Diese bestehen aus den Gen-Abschnitten, die für die 18S-, 5,8S- und die 26S-RNA codieren und von nicht kodierenden Spacerregionen (*internal transcribed spacer*, ITS) getrennt werden (Abbildung 13). Unter Verwendung von in den flankierenden hochkonservierten 18S- und 26S-rRNA-Genen bindenden PCR-Primern

(Ker010-F und Ker012-R) können die ITS-Regionen 1 und 2 einschließlich des 5,8S-rRNA-Gens schnell und einfach amplifiziert und sequenziert werden. Die Variabilität der ITS-Bereiche ist dabei hoch genug, um phylogenetische und taxonomische Unterschiede selbst innerhalb der selben Gattung aufzuzeigen (Baldwin *et al.* 1995). Somit ist es möglich, bei nachfolgenden Lieferungen schnell die Identität des Drogenmaterials prüfen zu können.



Abbildung 13 | Anordnung der ITS-Region sowie der Bindungsstelle der verwendeten Primer (grüne Pfeile geben die Orientierung und Position der Primer an) (modifiziert nach Baldwin *et al.* 1995)

Die verwendeten Primer Ker010-F und Ker012-R (Kapitel 3.1.9.) wurden freundlicherweise von PD Dr. Werner Knöß (Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, Bonn) zur Verfügung gestellt.

Das getrocknete Pflanzenmaterial wurde unter Zugabe von Seesand mit einem Pistill in einer Reibschale zerkleinert. Aus dem gewonnenen Drogenpulver (50 mg) erfolgte die Extraktion der genomischen DNA unter Verwendung des *DNeasy® Plant Mini Kits* (Qiagen). Die erhaltene DNA wurde anschließend durch Ethanolfällung gereinigt und bei 4 °C in low-TE-Puffer gelagert. Die Amplifikation der ITS-Regionen ITS1 und ITS2 erfolgte mit nachfolgend dargestellten PCR-Programm und -Reaktionsansatz (Tabelle 7).

Die Amplifikate wurden mittels Agarosegelelektrophorese unter Verwendung eines TBE-Puffersystems aufgetrennt. Dabei enthielt das 1%ige (*m/V*) Agarose-Gel 0,5 µg/ml Ethidiumbromid. Unter UV-Licht wurden die entsprechenden Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit dem *Qiaquick® Gel Extraction Kit* (Qiagen) gereinigt. Die nach Elution gewonnene DNA wurde anschließend durch Ethanolfällung gereinigt und bei -20 °C in MQ-Wasser gelagert. Die Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte bei Eurofins MWG Operon (Martinsried) unter Verwendung der Primer Ker010-F und Ker012-R. Zur abschließenden Analyse der ITS-Sequenzdaten wurden diese mit anderen Sequenzen mit dem Programm *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) von NCBI verglichen.

Tabelle 7 | Reaktionsansatz und dazugehöriges PCR-Programm

Reaktionsansatz		Programmschritt	Zyklen	Nr.	9 [°C]	t [s]
5 µl	Taq-Reaktionspuffer (10x)	Denaturierung	1	1	95	180
0,25 µl	Primer Ker010-F (50 pmol/µl)	Amplifizierung	39	1	95	30
0,25 µl	Primer Ker012-R (50 pmol/µl)			2	59	30
5 µl	dNTPs (2 mM)			3	72	60
2 µl	Genomische DNA (25 ng)	Elongation	1	1	72	600
37,5 µl	MQ-Wasser					

Expression rekombinanter Proteine

Expression in *E. coli* BL21 (DE3)

Zur heterologen Expression von Apolipoprotein E wurde der *E.-coli*-Expressionstamm BL21 (DE3) mit den Plasmiden pGEX-6P-1ApoE3, pGEX-6-1ApoE4, pGEX5TApoE3 und pGEX5TApoE4 durch Elektroporation (nach Standardprotokoll) transformiert. Die Anzucht der Bakterien erfolgte in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin. In Abhängigkeit der Kultivierungsbedingungen (30 °C bzw. 37 °C, 200 rpm) betrug das Animpfvolumen 1-2 % (V/V) der Hauptkultur. Nach Erreichen einer Zelldichte ($OD_{600} = 0,6$) wurde die ApoE-Expression durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,5 mM) induziert und die Kultivierung unter gleichen Bedingungen für weitere 3 h fortgesetzt. Anschließend wurden die Bakterien bei 8000 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Feuchtgewicht des Zellpellets bestimmt. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Die durch Fermentation gewonnenen Bakterien wurden nach Resuspendieren in eiskaltem PBS-Puffer (300 mM NH_4HCO_3 ; 0,15 µM Aprotinin; 1 µM Leupeptin; 1 mM AEBSF; 10 µl DNase (3 U/µl) sowie 1 mg/ml Lysozym) 30 min auf Eis inkubiert und anschließend durch Ultraschallbehandlung lysiert. Die vollständige Zelllyse wurde dabei mikroskopisch überprüft. Nach Bedarf erfolgte eine Wiederholung der Ultraschallbehandlung. Zur Abtrennung des Zellbruchs wurde die Suspension durch Zentrifugation für 30 min bei 4 °C und 9000 x g behandelt. Der pH-Wert des so gewonnenen Überstandes wurde auf pH = 7 eingestellt und weiterverwendet bzw. zur Lagerung bei -80 °C mit Glycerin versetzt (10 % (V/V)).

Expression in *S. cerevisiae* (INVSc1)

Die Transformation von *S. cerevisiae* mit den Plasmiden pEKGKApoE3 bzw. pEKGKApoE4 erfolgte nach der Methode von Klebe *et al.* (1983). Zur Selektion transformierter Hefezellen wurden diese auf einem Minimalmedium ohne Uracil kultiviert.

Die Anzucht der transformierten Hefen erfolgte im Fermentationsmedium (siehe Kapitel 3.1.7.) bei 30 °C und 250 rpm. Die Fermentation gliederte sich in Wachstums- und Induktionsphase. Zunächst wurde eine Vorkultur über Nacht mit 2 % (m/V) Glucose-Medium angesetzt. Anschließend erfolgte ein Animpfen der Hauptkultur mit 10 % (V/V) der Vorkultur in einem Glucose-Fermentationsmedium. Nach Erreichen einer Zelldichte ($OD_{600} = 2$) wurde die ApoE-Expression durch Wechsel des Kultivierungsmedium (Galactose-Fermentationsmedium) induziert und die Kultivierung unter gleichen Bedingungen für 20 h fortgesetzt. Durch zehnmündige Zentrifugation bei 8000 x g und 4 °C wurden die Hefen sedimentiert, der Überstand anschließend verworfen und das Feuchtgewicht des Zellsedimentes bestimmt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80 °C.

Die durch Fermentation gewonnenen Hefezellen wurden nach Resuspendieren in eiskaltem PBS-Puffer (300 mM NH_4HCO_3 , 0,15 μ M Aprotinin, 1 μ M Leupeptin, 1 mM AEBSF, 10 μ l DNase (3 U/ μ l)) 30 min auf Eis inkubiert und anschließend mit Hilfe des Hochdruck-Homogenisators *French® Press* (Firma G.Heinemann, Schwäbisch Gmünd) bei 138 bar lysiert. Die vollständige Zelllyse wurde mikroskopisch überprüft. Zur Abtrennung des Zellbruchs wurde die Suspension für 30 min bei 4 °C und 9000 x g zentrifugiert. Der pH-Wert des so gewonnenen Überstandes wurde auf pH = 7 eingestellt und weiterverwendet bzw. zur Lagerung bei -80 °C mit Glycerin (10 % (V/V)) versetzt.

Reinigung des GST-ApoE-Fusionsproteins

Zur Abtrennung des rekombinanten Proteins von *E.-coli*-Proteinen wurde gemäß der Anleitung des Herstellers das GST-ApoE-Fusionsprotein an eine Affinitäts-Matrix (Glutathion-SepharoseTM 4B) gebunden. Die Reinigung erfolgte über ein Batch-Verfahren. Dabei wurde das Lysat auf die Matrix aufgegeben und über Nacht bei 4 °C drehend inkubiert. Nachfolgend wurde die Matrix dreimal mit PBS-Puffer (300 mM NH_4HCO_3 , 0,15 μ M Aprotinin, 1 μ M Leupeptin, 1 mM AEBSF) gewaschen, und das Fusionsprotein wurde in drei Schritten mit je 1 ml Elutions-Puffer (50 mM Tris; 25 mM reduziertes Glutathion; pH 8) eluiert. Die

gewonnenen Eluate bzw. Affinitäts-Matrizes wurden bei -80 °C gelagert. Die Analyse der Reinheit erfolgte mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese.

Abspaltung des GST-Fusionsteils

Die mit Hilfe des Plasmides pGEX-6-P1 exprimierten GST-Fusionsproteine besitzen zwischen dem GST-Fusionsteil und dem gewünschtem Protein eine PreScission-Protease-Schnittstelle. Im Gegensatz zu dem Plasmid pGEX-6-P1 besitzen die Plasmide pEGKT und pGEX5T eine Thrombin-Protease-Schnittstelle zwischen dem GST-Fusionsteil und gewünschtem Protein. Zur Abspaltung des GST-Fusionsproteins wurde das gewonnene Eluat über Nacht bei 4 °C gegen den entsprechenden Proteasepuffer (Thrombin-Proteasepuffer: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 25 mM red. Glutathion, PreScission-Proteasepuffer: 50 mM Tris, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 mM DTT) dialysiert. Für 1 mg Fusionsprotein werden 1,25 U Thrombin benötigt. Der Proteaseverdau erfolgte bei 4 °C über Nacht. Abweichend zum Thrombin-Verdau wird bei der PreScission-Protease das noch an der Matrix gebundene Fusionsprotein gespalten. Dafür wurde die Fusionsprotein-Matrix mit Protease-Puffer gewaschen und entsprechend 2 U PreScission-Protease pro 100 µg Fusionsprotein dazugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C für 4 Stunden. Da die PreScission-Protease selbst einen GST-Tag aufweist, bindet das Enzym nach Spaltung an freie Stellen der Affinitäts-Matrix. Damit enthält der Überstand nach Zentrifugation das rekombinante Protein ohne Fusionsteil. Der gewonnene Überstand wurde bei -80 °C gelagert und mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese analysiert.

3.2.3. Proteinbiochemische Methoden

Western-Blot

Beim Western-Blot-Verfahren werden Proteine von einem SDS-Gel auf eine adsorbierende Membran elektrophoretisch übertragen und mit einem spezifischen Antikörper markiert. In der vorliegenden Arbeit wurden Proteinextrakte, wie oben beschrieben, elektrophoretisch getrennt und anschließend unter Verwendung des Tank-Blot-Systems XCell II™ von Invitrogen nach Hersteller Angaben auf eine PVDF-Membran übertragen. Danach wurde die Membran für 1 h in Blockierungspuffer inkubiert. Anschließend erfolgte eine Behandlung mit proteinspezifischen primären Antikörpern über Nacht bei 4 °C. Vor Zugabe des sekundären Antikörpers wurde die Membran mit TBS/T-Lösung dreimalig für 15 min gewaschen. Die Detektion der spezifischen Protein-Antikörper-Bindung erfolgt durch Elektrochemilumineszenzreaktion (ECL) unter Verwendung eines ECL-Substrates auf einem Röntgenfilm.

Für weitere Untersuchungen wurden die gebundenen Antikörper durch Behandlung mit „Stripping-Puffer“ bei 56 °C für 30 min wieder von der Membran gelöst. Nach anschließenden Waschschritten (mindestens 2 h) mit TBS/T wurde dann die Membran wie beschrieben mit anderen spezifischen Antikörpern behandelt.

Zellextraktgewinnung

Für den Nachweis des NMDA-Rezeptors wurden Zellen mit 4 µM Dexamethason behandelt. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Nach Zugabe von 5 ml Kulturmedium wurden die Zellen 10 min bei 5000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde in 200 µl RIPA-Lysepuffer resuspendiert und 60 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 16000 x g für 15 min. Der erhaltene Überstand, der als Zellextrakt bezeichnet wird, wurde bis zur weiteren Verwendung aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt. Proteinkonzentrationen der Zellextrakte wurde nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt.

Solubilisierungsversuche

Zur Isolierung von aggregiertem Apolipoprotein E aus der unlöslichen Fraktion bzw. aus Einschlusskörpern wurde das bei der Zentrifugation erhaltene Zellsediment (nach Zellaufschluss unlösliche Zellbestandteile) zum Lösen, in 20 ml PBS-Puffer mit 300 mM NH_4HCO_3 und 0,5 % (V/V) Triton® X-100 resuspendiert und anschließend mit 10000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Ein aliquoter Teil wurde für GST-Fusionsprotein-Reinigung verwendet. Der andere Teil des Überstandes wurde in ein Becherglas überführt und unter Rühren schrittweise mit Ammoniumsulfat (30 %, 60 % und 80 % (m/V) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) versetzt. Der Ansatz wurde für 1 Stunde gerührt und anschließend zentrifugiert (4 °C, 10000 x g, 15 min). Das erhaltene Sediment wurde in PBS-Puffer (mit 300 M NH_4HCO_3 , 0,15 µM Aprotinin, 1 µM Leupeptin, 1 mM AEBSF) resuspendiert und bei Raumtemperatur für 2 h unter Rühren inkubiert.

Zur Entfernung von Ammoniumsulfatresten wurde der Überstand für 12 h bei 4 °C gegen 2 l PBS-Puffer dialysiert. Dabei wurde mehrfach der Puffer gewechselt. Das Dialysat wurde abschließend zentrifugiert (10000 x g, 4 °C), aliquotiert und bei -80 °C gelagert oder zur weiteren Reinigung des Fusionsproteins verwendet.

Alternativ wurde das Sediment von aggregiertem Apolipoprotein E in Guanidiniumhydrochlorid-haltigem Puffer (10 mM Tris, 100 mM NaH₂PO₄, 6 M Guanidiniumhydrochlorid, 1 mM DTT, pH 8) aufgelöst und über Nacht bei 4 °C stehen gelassen. Nach Zentrifugation bei 10000 x g und 4 °C für 15 min wurde der Überstand über eine Ni-Chelat-Säule (Qiagen, Hilden) gegeben und ausgiebig mit Wasch-Puffer (10 mM Tris, 100 mM NaH₂PO₄, 6 M Guanidiniumhydrochlorid, pH 6,3) gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgte mit Puffern unterschiedlicher pH-Werte (pH 6,3; pH 5,9 und pH 4,5). Zur Kontrolle der Eluate wurden Proben mit TCA präzipitiert (siehe Anleitung Qiagen „The QIAexpressionistTM“, TCA-Präzipitation) und eine SDS-PAGE durchgeführt.

3.2.4. Zellassays

3.2.4.1. NMDA-Rezeptor-Assay (Glutamat-vermittelte Exzitotoxizität)

Der NMDA-Rezeptor-Assay (NMDA-Assay) wurde zur *In-Vitro*-Stimulation via NMDAR durch Glutamat-Überschuss in Neuronen bei Alzheimer-Demenz und anderer neurodegenerativer induzierter pathologischer Phänomene mit dem Ziel der Untersuchung potentieller Inhibitoren durchgeführt. Der Prozess wird durch Zugabe von L-Glutamat und Glycin in Gang gesetzt. Die Überstimulierung des NMDA-Rezeptors führt zu einem erhöhten Calciumeinstrom, der wiederum eine Aktivierung verschiedener Lipasen, Proteasen, Stresskinasen und Phosphatasen auslöst, was schließlich zur Schädigung von Neuronen führt (Exzitotoxizität). Für die Bestimmung der antagonistischen Wirkung am NMDA-Rezeptor standen zwei transgene murine Fibroblasten-Zelllinien zur Verfügung, die den Rezeptorionenkanal mit den Untereinheiten NR1-1a/NR2A (L12-G10) und NR1-1a/NR2B (L13-E6) exprimieren (siehe auch Kapitel 3.1.14.). Die Regulation der Rezeptor-Expression erfolgt durch Zugabe von Dexamethason und wird über ein *glucocorticoid responsive element* vermittelt.

Zur Messung der neuroprotektiven Wirkung durch Blockade des NMDA-Rezeptors werden Zellen mit Extrakten bzw. Reinsubstanzen behandelt. Anhand der Verringerung der Exzitotoxizität kann die entsprechende Wirkung am NMDA-Rezeptor bestimmt werden. Als Referenzen wurden die bekannten NMDA-Rezeptor-Antagonisten Memantin, Ketamin und MK-801 verwendet.

Durchführung des NMDA-Assays

Die murinen Zelllinien L12-G10 (L12) und L13-E6 (L13) wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Dieter Steinhilber, Universität Frankfurt, zur Verfügung gestellt. Der Exzitotoxizitätstest wurde mit einigen Modifikationen analog der Methode von Steinmetz *et al.* (2000) durchgeführt.

Die Mausfibroblasten wurden routinemäßig mit MEM (Earle's Salts mit Phenolrot) unter Zusatz von 10 % (V/V) FKS, 0,5 mM Natriumpyruvat, 1 % (V/V) Penicillin/Streptomycin, 800 µg/ml G418 und 100 µM Ketamin kultiviert. Aufgrund der Tatsache, dass auch ohne Zugabe des Induktors Dexamethason eine basale Expression des NMDA-Rezeptors stattfindet und das Zellkulturmedium die Aminosäuren Glutaminsäure und Glycin enthält, ist Ketamin ein Grundbestandteil des Mediums, um NMDAR-vermittelte cytotoxische Effekte zu unterdrücken.

Zur Testung von Substanzen auf antagonistische Wirkungen an den beschriebenen NMDA-Rezeptor-Untereinheiten wurden die jeweiligen DMSO-Stammlösungen vorab entsprechend mit phenolrotfreiem MEM zu Konzentrationen von 0,01 - 100 µM verdünnt (DMSO-Endkonzentration 0,1 %). Es wurden jeweils eine Maximum-Kontrolle (ohne Zusatz von Ketamin; 100%ige Exzitotoxizität) und eine Minimum-Kontrolle (Zusatz von 100 µM Ketamin; 0%ige Exzitotoxizität) mitgeführt.

Zur Durchführung des Assays wurden in eine 96well-Mikrotiterplatte 10.000 Zellen/well in je 200 µl Kulturmedium (siehe oben) ausgesät. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ für 30 h inkubiert. Danach wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt, das zusätzlich 4 µM Dexamethason enthielt. Nach 16-stündiger Inkubation wurden die Zellen zweimal mit phenolrotfreiem MEM unter Zusatz von 1 % (m/V) BSA und einmal mit phenolrotfreiem MEM gewaschen, um das Ketamin möglichst vollständig zu entfernen. Dann erfolgte eine 30-minütige Vorinkubation mit Testsubstanzen bzw. Kontrollen (37 °C, 5 % CO₂). Die Probenverteilung der 6 Parallelen erfolgte so, dass keine Probe nur am Rand oder nur in der Mitte positioniert war. Die 2 x 3 Proben wurden so angeordnet, dass senkrechte, benachbarte wells die gleiche Probe enthielten (Abbildung 14). Damit sollte eine Beeinflussung der Testergebnisse durch „Randeffekte“ auf ein Minimum reduziert werden (Rasmussen und Nielsen 2002).

PBS	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	PBS
PBS	MIN _k	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	MAX _k	PBS
PBS	MIN _k	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	MAX _k	PBS
PBS	MIN _k	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	MAX _k	PBS
PBS	P5	P6	P7	P8	MAX _k	MIN _k	P1	P2	P3	P4	PBS
PBS	P5	P6	P7	P8	MAX _k	MIN _k	P1	P2	P3	P4	PBS
PBS	P5	P6	P7	P8	MAX _k	MIN _k	P1	P2	P3	P4	PBS
PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

Abbildung 14 | Pipettierschema für 96well-Mikrotiterplatte beim NMDA-Assay

SK – Substanzkontrolle (ohne Zellen), MIN_k – minimale Exzitotoxizität (Kontrolle mit 100 µM Ketamin), MAX_k – maximale Exzitotoxizität (ohne Ketamin).

Anschließend wurde zur Induktion der Exzitotoxizität ein Gemisch aus Glycin und L-Glutamat (Endkonzentration je 10 µM) zugegeben und die Zellen nochmals für 4 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Bestimmung der Exzitotoxizität erfolgte durch kolorimetrische Messung der aus den abgestorbenen Zellen freigesetzten cytoplasmatischen Lactatdehydrogenase (LDH-Assay) mit Hilfe des *Cytotoxicity Detection Kit*[®] (Roche Diagnostics, Mannheim). Gemäß der Gebrauchsanweisung des Reagenzien-Kits wurden 100 µl Zellüberstand abgenommen und mit 100 µl Reaktionslösung versetzt. Nach 35-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss erfolgte die photometrische Bestimmung des aus Iodonitrotetrazoliumchlorid (INT) unter LDH-Katalyse gebildeten Formazans im MTP-Reader (HTS 7000 Perkin Elmer) bei 492 nm (Abbildung 15). Je Substanzkonzentration erfolgte eine Sechsfachbestimmung. Die Experimente wurden mindestens dreifach unabhängig voneinander durchgeführt. Um den Einfluss von Extrakten und Substanzen auf die Reduktion des Tetrazoliumsalzes zu bestimmen, wurden Substanzkontrollen (SK) der jeweiligen Proben mitgeführt. Die Probelösungen wurden hierbei ohne Zellen analog des beschriebenen Verfahrens mit der Reagenzlösung inkubiert und photometrisch gemessen. Die so ermittelte „Eigenabsorption“ wurde bei der Berechnung der Exzitotoxizitätswerte berücksichtigt. Um direkte LDH-Inhibition durch aktive Testsubstanzen außerdem auszuschließen, wurden Zellen wie beschrieben behandelt, jedoch ohne Stimulation durch L-Glutamat und Glycin. Anschließend wurden die Zellen

durch Zugabe von 1 % Triton® X-100 (Endkonzentration pro *well*) vollständig lysiert und die LDH-Aktivität im Vergleich zu den Kontrollen bestimmt.

Die Basislinie von 0 % Exzitotoxizität (A_{MIN}) wurde definiert als LDH-Freisetzung bei Stimulation des Rezeptorionenkanals mit L-Glutamat, Glycin und gleichzeitiger Blockade durch 100 μM Ketamin. Umgekehrt wurde 100 % Exzitotoxizität (A_{MAX}) definiert als LDH-Freisetzung bei Stimulation des Rezeptorionenkanals mit L-Glutamat, Glycin in Abwesenheit von Ketamin. Die Berechnung der Exzitotoxizitätswerte erfolgte mit folgender Gleichung (A = Absorption, $\lambda = 492 \text{ nm}$):

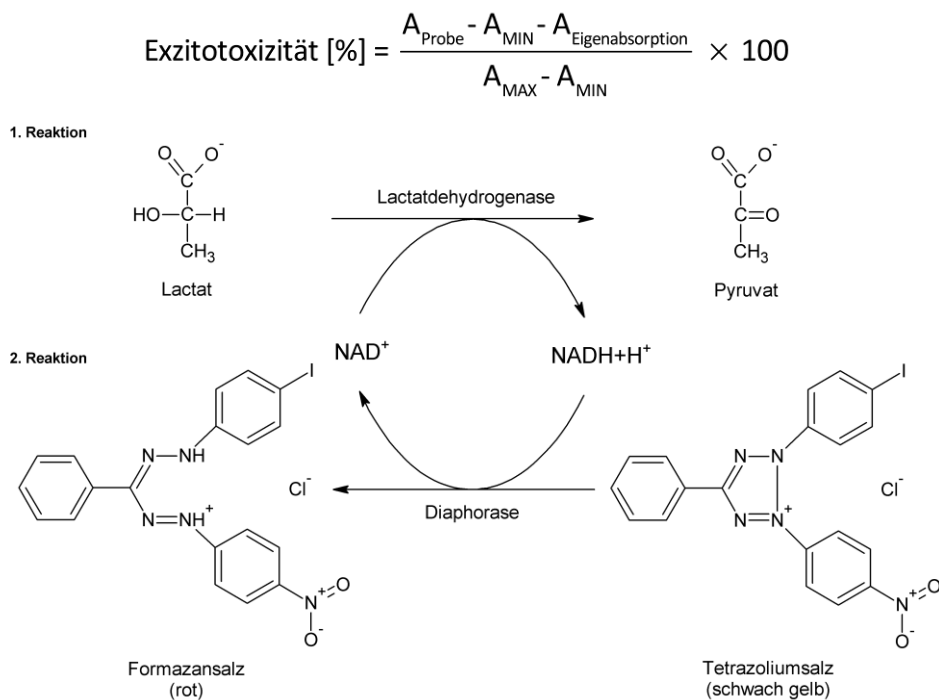


Abbildung 15 | Testprinzip des LDH-Assays (modifiziert nach Roche Diagnostics 2005b)

Die Berechnung der IC_{50} -Werte erfolgte mit Hilfe der Software GraphPad Prism™ 5.0 und der Parameter „nonlinear regression“, „sigmoidal dose response“ und „variable slope“.

3.2.4.2. Zellviabilitätsassay (MTT-Assay)

Der MTT-Assay ist ein enzymatischer Test, um die Vitalität (Viabilität) von Zellen im Vergleich zu einer Kontrollprobe zu bestimmen. Der von Mosmann (1983) erstmalig beschriebene Assay beruht auf der Reduktion des gelben wasserlöslichen MTT-Farbstoffes (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid, Thiazolylblau) zu einem violetten wasserunlöslichen Formazansalz, dessen Konzentration nach Solubilisierung kolorimetrisch bestimmt werden kann. Die Menge gebildeten Formazans ist dabei proportional zur Zahl

lebender Zellen. Dieser zelluläre Reduktionsprozess ist hauptsächlich assoziiert mit Enzymen des Endoplasmatischen Retikulums und abhängig von intrazellulär gebildeten Reduktionsäquivalenten NADH und NADPH. Eine partielle Reduktion von MTT erfolgt außerdem in Mitochondrien durch die Succinatdehydrogenase (mitochondrialer Komplex II). Somit entspricht die Menge an umgesetztem Thiazolylblau der Glykolyserate bzw. der Atmungsrate der Zelle (Berridge *et al.* 1996). Ziel der Durchführung des MTT-Assays war es, einen Hinweis zum Einfluss von Substanzen und auf die Zellvitalität von Zellen zu erhalten.

Durchführung des MTT-Assays mit SH-SY5Y Zellen

Für die Bestimmung der Zellvitalität wurden 10.000 Zellen/*well* in eine 96*well*-Mikrotiterplatte mit 150 µl Kulturmedium (DMEM mit Phenolrotzusatz, 10 % (V/V) FKS, 1 % (V/V) Penicillin/Streptomycin) ausgesät und im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ für 24 h inkubiert. Die äußeren Reihen wurden mit sterilem PBS befüllt und für den Assay nicht verwendet, um abweichende Temperaturbedingungen am Rand der Mikrotiterplatte und dadurch abweichendes Wachstumsverhalten zu minimieren (Rasmussen und Nielsen 2002). Die zu testenden Substanzen und Extrakte wurde in den entsprechenden Konzentrationen im Verhältnis 1:1000 mit Medium (DMSO Endkonzentration 0,1 %) verdünnt. Mit einer Multikanalpipette wurden vorsichtig das verbrauchte Medium abgesaugt und ohne Waschschrift die Probelösungen (150 µl) zugegeben. Als 100%-Vitalitätskontrolle diente DMSO-haltiges Medium (Endkonzentration 0,1 %). Die Probenanordnung erfolgte wie in Kapitel 3.4.2.1. beschrieben. Nach erneuter 24-stündiger Inkubation erfolgte die Vitalitätsbestimmung mit MTT. Dazu wurden mit einer Mehrkanalpipette das Medium abgesaugt und je *well* 100 µl MTT-Lösung (0,5 mg/ml MTT in phenolrotfreiem, serumfreiem DMEM) zugegeben. Die oberste Reihe (Substanzkontrolle, SK) wurde äquivalent behandelt. Nach vierstündiger Inkubation (37 °C, 5 % CO₂) erfolgte die Zugabe von je 100 µl pro *well* einer 20%igen SDS-Lösung. Durch die konzentrierte Tensid-Lösung werden die Zellen zerstört und die Bildung des violetten Formazans gestoppt. Um eine vollständige Zelllyse und das vollständige Lösen der gebildeten Formazankristalle zu gewährleisten, erfolgte eine weitere Inkubation über Nacht. Nun wurden die Mikrotiterplatten am nächsten Morgen leicht agitiert und anschließend im MTP-Reader photometrisch ($\lambda = 544 \text{ nm}$) gemessen. Je Substanzkonzentration erfolgte eine Sechsfachbestimmung, wobei die Experimente mindestens dreifach unabhängig voneinander an verschiedenen Tagen durchgeführt

wurden. Die gemessenen Absorptionswerte wurden unter Berücksichtigung der Substanzkontrollen zur Lösungsmittelkontrolle (100 % Vitalität) ins Verhältnis gesetzt.

Durchführung des MTT-Assays mit L12-G10 Zellen

Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte leicht modifiziert analog der Durchführung mit SH-SY5Y. Es wurden nur 7.000 Zellen pro *well* in MEM-Kulturmedium ausgesät. Nach 24-stündiger Inkubation erfolgte ein Wechsel mit Dexamethason- und Ketamin-haltigem Medium (4 μ M Dexamethason, 100 μ M Ketamin), um ähnliche Bedingungen wie beim NMDA-Assay zu erhalten.

3.2.4.3. ApoE-Peptid-vermittelte Toxizität (ApoE-Assay)

Für die Bestimmung der Toxizität des Tandem-ApoE-Peptides (Aminosäuresequenz (141-155)²: LRKLRKRLRDADDLLRKLRKRLRDADDL) wurden 5,8 mg der Verbindung in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Diana Imhof (Institut für Biochemie, Friedrich-Schiller-Universität Jena) synthetisiert. Das Peptid wurde in DMSO zu 20 mM gelöst und bei -20 °C gelagert.

Für den Assay wurden 20.000 SH-SY5Y Zellen pro *well* in eine 96*well*-Mikrotiterplatte mit 150 μ l Kulturmedium (DMEM mit Phenolrotzusatz, 10 % (V/V) FKS, 1 % (V/V) Penicillin/Streptomycin) ausgesät und im CO₂-Inkubator für 24 h inkubiert. Zur Vermeidung von Randeffekten wurden die äußeren Reihen mit PBS befüllt. Nach 24-stündiger Inkubation erfolgte mit einem Mediumwechsel die Zugabe des ApoE-Peptides mit einer Konzentration von 50 μ M pro *well*. Um neuroprotektive Effekte von Extrakten und Substanzen zu testen, wurden diese in entsprechenden Konzentrationen zugegeben und die Mikrotiterplatte für 24h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Als Kontrollen wurden DMSO (entspricht der maximalen DMSO-Konzentration pro *well*) und eine 50 μ M ApoE-Peptid-Kontrolle mitgeführt. Die Durchführung und Aufteilung der Proben bzw. die Berechnung der Vitalität wurden analog dem oben beschriebenen MTT-Assay durchgeführt.

3.2.4.4. Kompetitionsversuche mit Spermin

Um mögliche Rückschlüsse auf Bindungsstellen am NMDA-Rezeptor zu erhalten, wurden L12-Zellen analog dem NMDA-Assay (Kapitel 3.2.4.1.) behandelt, aber zusätzlich mit verschiedenen Konzentrationen von Spermin vorinkubiert. Nach dieser 10-minütigen Präinkubation von Spermin erfolgte die Zugabe der Testsubstanzen (25 μ M). Nach weiterer 20-minütiger Inkubation wurde zur Induktion der Exzitotoxizität L-Glutamat und Glycin

(10 μM Endkonzentration) zugegeben und die Zellen für 4 h bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Die Bestimmung der Exzitotoxizität erfolgte analog der Beschreibung für den NMDA-Assay (Kapitel 3.2.4.1.)

3.2.4.5. PCP- und NR2B-spezifischer Bindungs-Assay (Kompetitionsbindungsstudien)

Die Rezeptor-Bindungsstudien wurden am Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Universität Münster von der Arbeitsgruppe von Prof. Bernhard Wünsch durchgeführt. Bei Kompetitionsbindungsstudien werden konstante Konzentrationen an radioaktiv markierten Liganden ($[^3\text{H}]$ Ifenprodil, $[^3\text{H}]$ -(+)-MK-801) durch steigende Konzentrationen nicht radioaktiv markierter Liganden (Testsubstanz) aus der Rezeptorbindung verdrängt. Aus den erhaltenen Daten, bei bekanntem K_d -Wert des Radioliganden, wird die Affinität des nicht markierten Liganden (Kompetitor) zum jeweiligen Rezeptor durch Berechnung des K_i -Wertes ermittelt.

Die Bestimmung NR2B-spezifischen Bindung erfolgte an isolierten Membranen von Zellen der murinen Fibroblastenzelllinie L13-E6. Zur Durchführung des Assays wurden in eine 96-*well*-Mikrotiterplatte ca. 20 μg präparierte Zellmembran pro *well* mit sechs verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanz und mit 5 nM $[^3\text{H}]$ Ifenprodil ($K_d = 7,6$ nM) in einem Tris/EDTA-Puffer (5 mM/1 mM, pH 7,5) mit einem Gesamtvolumen von 200 μl versetzt. Nach Ablauf der 120-minütigen Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion gestoppt und die freien ungebundenen Liganden durch zügiges Filtrieren (Vakuumfiltration durch Filtermatten) und fünfmaliges Waschen entfernt. Anschließend erfolgte die Detektion der noch gebundenen Radioliganden im Szintillationsmessgerät.

Die Bestimmung der PCP-spezifischen Bindung durch Verdrängung von radioaktiv markierten $[^3\text{H}]$ -(+)-MK-801 ($K_d = 2,26$ nM) erfolgte nach der Methoden von Wirt *et al.* (2007).

3.2.5. Phytochemische Methoden

Dünnschichtchromatographie

Folgende Fließmittelsysteme wurden für die Dünnschichtchromatographie verwendet:

FM 1:	Ethylacetat-Ameisensäure-Essigsäure-Wasser (100:11:11:27)
FM 2:	Aceton-Dichlormethan-Methanol-Wasser (75:10:10:5)
FM 3:	Dichlormethan-Methanol (15:1)
FM 4:	Methanol-Wasser (30:70)
FM 5:	Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (90:5:5)

Die Probenlösungen wurden bei Raumtemperatur unter Zuhilfenahme eines Kaltlufttrockners aufgetragen. Die Chromatogramme wurden in DC-Kammern mit Kammersättigung entwickelt. Als Vergleichssubstanzen wurden folgende Standards verwendet: (+)-Catechin, (-)-Epicatechin, Procyanidin B-1 und Procyanidin B-3. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte, wenn möglich, anhand der Eigenfärbung der Verbindung bei Tageslicht oder mit Hilfe einer UV-Licht-Dokumentation bei 254 nm bzw. 366 nm. Zusätzlich wurden die DC-Platten mit verschiedenen Sprühreagenzien (Tabelle 8) behandelt. Zur Intensivierung der Farbreaktion wurden die DC-Platten nach dem Besprühen mit Anisaldehyd für 5 min auf einer Heizplatte bei 100 °C erwärmt. Naturstoff-Reagenz und Macrogol 400 wurden in Kombination verwendet.

Tabelle 8 | Zusammensetzung verwendeter Sprühreagenzien

Sprühreagenz	Zusammensetzung	
Anisaldehyd-Reagenz	Anisaldehyd	0,5 ml
	Eisessig	10 ml
	Methanol	85 ml
	Schwefelsäure, konz.	5 ml
Dragendorff-Reagenz (Stammlösung)	Basisches Bismutcarbonat	2,6 g
	Natriumjodid	7 g
	Eisessig	25 ml
	(zum Sieden erhitzen, filtrieren)	
	Filtrat	20 ml
Dragendorff-Reagenz (Arbeitslösung)	Ethylacetat	80 ml
	Stammlösung	10 ml
	Eisessig	20 ml
Macrogol 400	Ethylacetat	40 ml
Naturstoff-Reagenz	Polyethylenglycol 400	50 g
	Methanol	1000 ml
Vanillin-HCl	Diphenylboroxyethylamin	10 g
	Methanol	1000 ml
FeCl ₃ -Reagenz	Vanillin	1 g
	Ethanol	100 ml
	(anschließend mit konz. Salzsäure besprühen)	
FeCl ₃ -Reagenz	FeCl ₃	10 g
	Wasser	100 ml

Gewinnung von Extrakten aus TCM-Drogen

Zur Vorbereitung der Extraktion wurden die TCM-Drogen grob zerkleinert und in einer Zentrifugalmühle auf eine Korngröße von 1,5 mm pulverisiert.

Methanolische Extraktion

Für die Herstellung des Methanol-Extraktes wurde zunächst die gepulverte Droge mit Petrolether entfettet. 10 g Droge wurden mit 100 ml Petrolether versetzt und für 24 h

geschüttelt. Anschließend erfolgte eine Filtration über einen Faltenfilter und eine Trocknung des Extraktes im Stickstoffstrom. Zur Grobfractionierung vorwiegend lipophiler Bestandteile wurde nach der Entfettung eine Extraktion mit Chloroform vorangestellt. Dazu wurde 1 Teil entfetteter Droge mit 10 Teilen Chloroform über 24 h unter Schütteln extrahiert und filtriert. Der Extraktionsprozess wurde zweimal wiederholt. Die gewonnenen Extrakte wurden nachfolgend vereinigt, am Rotationsdampfer eingeeengt und abschließend gefriergetrocknet. Der Drogenrückstand wurde nachfolgend mit 100 ml Methanol analog der Chloroformextraktion behandelt. Alle gewonnenen Extrakte wurden nach der Gefrierdrying in Gläschen überführt und bei -80 °C gelagert.

Wässrige, traditionell-chinesische Extraktion

Zusätzlich wurden die TCM-Drogen nach der traditionellen-chinesischen Methodik zubereitet (Hempfen und Fischer 2007). Dazu wurden 20 g gemahlene Droge in 300 ml Wasser eingeweicht, aufgekocht und für 20 min am Kochen gehalten. Die Droge muss dabei stets mit Wasser bedeckt sein. Anschließend wurde der wässrige Überstand abgenommen und der Drogenrückstand wieder mit 300 ml Wasser zum Kochen (30 min) gebracht. Die gewonnenen Überstände wurden abschließend vereinigt, bei 3300 x g zentrifugiert und gefriergetrocknet. Die Lagerung erfolgte luftdicht bei -80 °C in Glasgefäßen.

Herstellung von Extrakten aus *Pipturus argenteus*

Die Herstellung der Extrakte der Pflanze *P. argenteus* (Voucher-Nummer: 2766-1.9) erfolgte durch beschleunigte Lösungsmittlextraktion (DIONEX ASE® 100-Anlage). Vor der Extraktion wurden insgesamt 500 g getrocknete innere Rinde grob zerkleinert und anschließend in einer Zentrifugalmühle auf eine Korngröße von 0,2 mm fein pulverisiert. Jeweils 25 g gepulverte Droge wurden mit 10 g Seesand versetzt und in eine Extraktionskartusche (Gesamtvolumen: 100 ml) mit Glasfaserfiltern eingefüllt. Nacheinander wurde mit Dichlormethan, Ethylacetat und Methanol erschöpfend extrahiert. Die Extrakte sollten sich in der Lipophilie ihrer Inhaltsstoffe unterscheiden.

Der Extraktionsvorgang erfolgte nach folgenden Parametern:

Drogeneinwaage:	25 g
Seesandeinwaage:	10 g
Druck:	100 bar
Temperatur:	50 °C
Heizzeit:	5 min
Flush:	60 %
Purge (N ₂):	200 s
Zyklenzahl:	3x statisch
Extraktionsprofil:	Dichlormethan → Ethylacetat → Methanol

Aus den gewonnenen Extraktlösungen wurden anschließend am Rotationsverdampfer (Wasserbadtemperatur max. 40 °C) unter vermindertem Druck das Lösungsmittel schonend entfernt. Die getrockneten Extrakte wurden abschließend in luftdichte Glasgefäße überführt und bei -20 °C gelagert. Zur weiteren Analyse der Inhaltsstoffspektren der Extrakte wurden diese dünnschichtchromatographisch untersucht.

Aktivitätsgeleitete Fraktionierung des *P. argenteus*-Extraktes

Zur Identifizierung aktiver Komponenten sollte der Extrakt von *P. argenteus* einer aktivitätsgeleiteten Fraktionierung zugeführt werden. Dazu wurde der durch beschleunigte Lösungsmittlextraktion gewonnene Extrakt in Wasser (ca. 2,5 g Extrakt in 100 ml MQ-Wasser) aufgenommen und in einem Scheidetrichter viermal gegen wassergesättigtes n-Butanol ausgeschüttelt (Verhältnis 1:1). Nach Trennung der Phasen wurde die Butanolphase abgenommen, bei 2500 x g zentrifugiert und mit Natriumsulfat behandelt. Nach Filtration wurde die Butanolphase am Rotationsverdampfer eingengt. Die gewonnenen Wasserphasen wurden vereinigt und gefriergetrocknet. Die Vorfraktionen (sowohl Wasser als auch Butanol) wurden in ein luftdichtes Glasgefäß überführt und bei -20 °C aufbewahrt. Zur Überprüfung der Aktivität im NMDA-Assay wurde ein aliquoter Teil entnommen und entsprechend verdünnt.

Gelfiltrationschromatographie an Sephadex™ LH-20

Zur präparativen Trennung der vorfraktionierten Proben wurde eine Größenausschlusschromatographie an Sephadex™ LH-20 (Partikelgröße 25-100 µm) durchgeführt. Für diese Gelfiltration wurde eine selbst gefüllte offene Glassäule (Säulenvolumen 693 ml, Länge 62,5 cm, Durchmesser 3,5 cm) verwendet. Nach vorheriger

Konditionierung der Säule mit 70 % (V/V) Ethanol wurden in 70 % (V/V) Ethanol gelösten Proben auf die Säule aufgegeben und nacheinander mit 70 % (V/V) Ethanol und 70 % (V/V) Aceton eluiert. Die Flussrate des Laufmittels betrug 1 ml/min. Das Eluat wurde fraktioniert (15 min Zeitintervall) aufgefangen. Nach DC-Prüfung der erhaltenen Reagenzglasfraktionen wurden Reagenzgläser mit gleichem oder ähnlichem Inhaltsstoffspektrum zusammengefasst, vereinigt und am Rotationsverdampfer unter Vakuum bei 40 °C eingeeengt. Waren die Fraktionen nach erfolgter Aufarbeitung noch nicht ausreichend getrennt, wurde eine Rechromatographie mit den entsprechenden Säulen und Laufmitteln angeschlossen. Zur Überprüfung der Aktivität der Fraktionen wurde ein aliquoter Teil entnommen und entsprechend verdünnt im NMDA-Testsystem untersucht.

Präparative Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Zur Gewinnung von Einzelverbindungen wurde eine HPLC-Anlage der Firma Varian (Varian Prostar Serie) mit einer C18-Säule von Knauer (Eurosphär-100) verwendet. Das zur Trennung verwendete MQ-Wasser wurde vor Verwendung filtriert. Alle Lösungsmittel wurden vor Gebrauch entgast. Zur Probenvorbereitung wurden die Fraktionen in 20 % (V/V) Methanol aufgenommen und über einen Membranfilter (Porengröße 0,2 µm) unlösliche Bestandteile entfernt. Die Trennung erfolgte nach folgendem HPLC-Programm:

HPLC der Fraktion C3.1 (Umkehrphase)

Gradientenelution:

Fließmittelsystem (Methanol/H₂O), Flussrate 6 ml/min, Raumtemperatur

0 min - MeOH/H₂O (20/80) → 20 min - MeOH/H₂O (80/20) →

22 min - MeOH/H₂O (20/80) → 45 min - MeOH/H₂O (20/80)

4. Ergebnisse

4.1. Apolipoprotein E - Assay

Apolipoprotein E ist als wichtigster Lipid-Transporter im Gehirn beteiligt an der Aufrechterhaltung und Reparatur von Neuronen (Mahley 1988). Für die ApoE-Protein-Familie gilt andererseits eine Isoform-abhängige Beteiligung an verschiedenen neuropathologischen Veränderungen im Gehirn als gesichert. Apolipoprotein E4 (ApoE4) gilt als gesicherter genetischer Risikofaktor für die sporadische Form der Alzheimer-Demenz (Bertram und Tanzi 2008). Es besteht ein signifikanter Gen-Dosis-Effekt für die Erkrankungshäufigkeit und das Alter der Erstmanifestation. Apolipoprotein E wird hierbei mit vielen pathologischen Prozessen der Alzheimerschen Erkrankung in Verbindung gebracht, wie z. B. Modulierung des Auf- und Abbaus sowie Clearance von A β -Peptiden und deren Ablagerung in senilen Plaques (Sadowski *et al.* 2006), cholinерger Dysfunktion, Lipid-Dysfunktion, gesteigertem oxidativen Stress, mitochondrialer Dysfunktion und schließlich Apoptose neuronaler Zellen (Mahley *et al.* 2006, Cedazo-Mínguez 2007). Außerdem bestehen für die ApoE-Familie Isoform-abhängige Unterschiede in der Proteinstabilität. ApoE4 bildet aufgrund seiner veränderten Konformation in höherem Maße neurotoxische Fragmente als ApoE2 und ApoE3 (Huang *et al.* 2001, Harris *et al.* 2003). Es sollte daher im Rahmen dieser Arbeit ein Testsystem entwickelt werden, um einerseits die neurotoxische Wirkung von ApoE4 und ApoE-Fragmenten belegen und untersuchen zu können und, andererseits neuroprotektiv wirkende Pflanzen-Extrakte, Naturstoffe und chemisch-synthetische Verbindungen zu identifizieren.

4.1.1. Heterologe Expression von Apolipoprotein E als GST-Fusionsprotein

Für den Aufbau eines ApoE-Bioassays sollten verschiedene ApoE-Isoformen durch heterologe Expression gewonnen, und für die Fusionsproteine ein Reinigungsprotokoll erarbeitet werden. Die Isolierung von Apolipoprotein E aus humaner Zellkultur erschien durch die geringe Expression und des Vorkommens verschiedener ApoE-Isoformen aufgrund unterschiedlicher ApoE-Allele als nicht sinnvoll. Daher sollte ApoE nach Klonierung des kodierenden Gens mit Hilfe eines eukaryotischen Hefeexpressionssystems oder eines bakteriellen Expressionssystems gewonnen werden.

Klonierung des humanen Apolipoprotein E-Gens

Zur heterologen Expression des ApoE-Fusionsproteins wurde cDNA der codierenden Region des humanen Apolipoprotein E3-Gens in die Expressionsvektoren pEGKT, pGEX-5T und pGEX-6P-1 kloniert. Für die Expression des rekombinanten Apolipoprotein E4 war es notwendig, gezielt eine Punktmutation im ApoE3-Gen einzuführen. Dafür erfolgte eine Einzelstrangmutagenese am Vektorkonstrukt pEGKTApoe3C. Der Nachweis der Punktmutation in den gewonnenen Plasmiden erfolgte durch Sequenzierung (Abbildung 16).

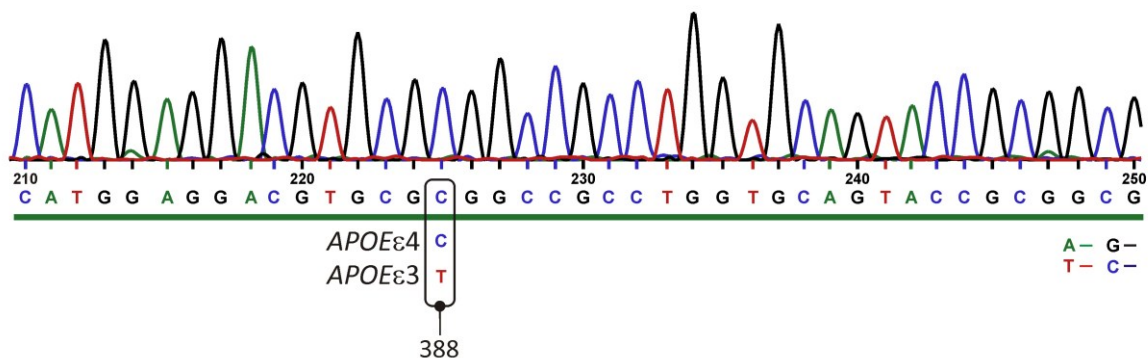


Abbildung 16 | Nukleinsäuresequenz (Ausschnitt) von Plasmid pEGKTApoe4C [25007]

Die entstandenen Vektoren wurden in die jeweiligen Expressionsstämme transformiert. Sie kodieren für die Fusionsproteine GST-ApoE3 und GST-ApoE4 mit einem Molekulargewicht von 61 kDa. Diese unterscheiden sich in der Protease-Schnittstelle zwischen dem Fusionsteil und dem zu exprimierenden Protein. Außerdem weisen die pGEX-5T-Vektoren einen zusätzlichen N-terminalen His-Tag auf. Eine Übersicht über erhaltene Expressionsklone und ihre Eigenschaften gibt Tabelle 9.

Tabelle 9 | Übersicht über erzeugte Expressionsklone

Klonebezeichnung	7.2	L13-3	L15-9	L18-8	L19-1
Expressionssystem	<i>S. cerevisiae</i> INVSc1	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)
Plasmid [Nr.]	pEGKT [25006]	pGEX-5T [25008]	pGEX-5T [25009]	pGEX-6P-1 [25010]	pGEX-6P-1 [25011]
Exprimiertes Protein	ApoE3	ApoE3	ApoE4	ApoE3	ApoE4
Tag	GST-Tag (N-terminal)	His-Tag, GST-Tag (N-terminal)	His-Tag, GST-Tag (N-terminal)	GST-Tag (N-terminal)	GST-Tag (N-terminal)
Protease-Schnittstelle	Thrombin	Thrombin	Thrombin	PreScission	PreScission

Heterologe Expression des GST-ApoE-Fusionsproteins

Die Expression der rekombinanten ApoE-Fusionsproteine erfolgte sowohl in *S. cerevisiae* (INVSc1) als auch in *E. coli* (BL21(DE3)). Die Induktionsbedingungen wurden so optimiert, dass ein hoher Expressionslevel bei gleichzeitiger guter Löslichkeit des Fusionsproteins erreicht wurde. Dabei wurden Temperatur, Induktorkonzentration, Kulturvolumen und Induktionsdauer variiert. Abbildung 17 zeigt den Vergleich zwischen der heterologen Expression des GST-ApoE-Fusionsproteins in *S. cerevisiae* (Abbildung 17A) und *E. coli* (Abbildung 17B). Nach Induktion war eine spezifische Bande in beiden Expressionssystemen mit dem erwarteten Molekulargewicht von 61 kDa im Gel sichtbar. Rohextrakte nicht-induzierter Zellen wiesen keine Bande auf entsprechender Höhe auf. Unterschiede zeigten sich in Hinblick der Expressionsstärke, d. h. die gebildete Menge an Fusionsprotein war im bakteriellen Expressionssystem deutlich höher. Dabei ist nicht die Expressionsrate von entscheidender Bedeutung, sondern letztendlich der lösliche Anteil des rekombinanten Zielproteins.

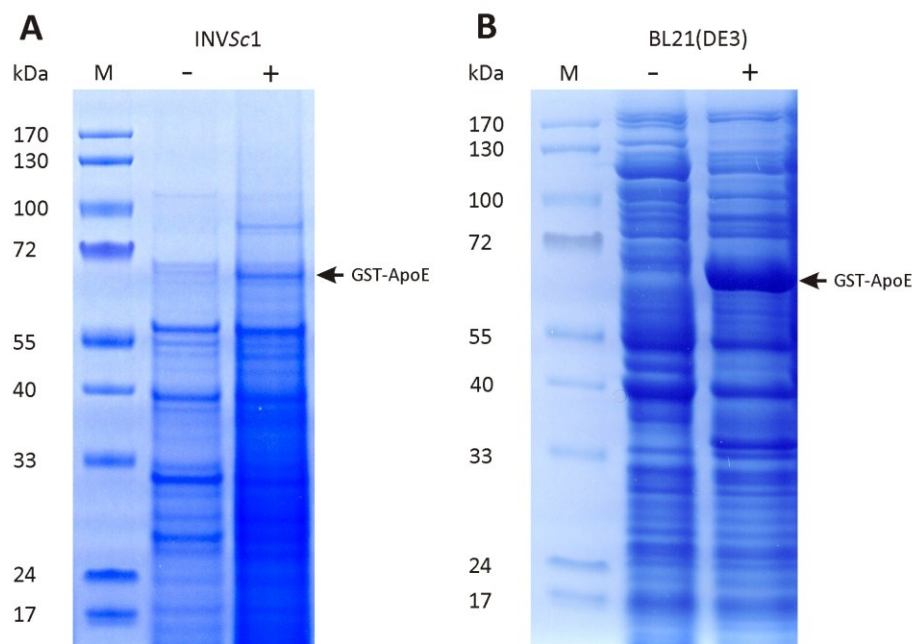


Abbildung 17 | SDS-PAGE - Vergleich der heterologen Expression des Fusionsproteins GST-ApoE in verschiedenen Expressionssystemen

(A) Hefeexpressionssystem mit N-terminalem GST, exprimiert bei 30 °C in *S. cerevisiae* (INVSc1), (-) nicht induziert, Glucosemedium, (+) induziert, Galactosemedium (B) Bakterieller Expressionssystem mit N-terminalem GST, exprimiert bei 37 °C in *E. coli* (BL21(DE3)), (-) nicht induziert, (+) induziert mit IPTG; M – Proteinmarker #SM0671 (Fermentas).

Bakterielle Expressionssysteme neigen häufig dazu, überexprimierte Proteine in Einschlusskörpern abzulagern. Eine nachfolgende Reinigung und die Wiederherstellung der Aktivität der Proteine können sich als schwierig erweisen. Deshalb kann es von Vorteil sein, das Zielprotein als Glutathion-S-Transferase-Fusionsprotein (GST-Fusionsprotein) zu exprimieren, da der GST-Fusionsteil die Stabilität und die Löslichkeit des Fusionsproteins günstig beeinflussen kann (Frangioni und Neel 1993).

In Abbildung 18 ist eine SDS-PAGE von Proben der löslichen und unlöslichen Zellfraktion von verschiedenen *E.-coli*-Expressionsklonen dargestellt. Hier ist zu erkennen, dass das überexprimierte GST-ApoE-Fusionsprotein vor allem in der unlöslichen Fraktion zu finden war. Weder eine Verkürzung der Induktionsdauer auf 2 h, noch die deutliche Reduktion des Kulturvolumens und die Kultivierung bei 30 °C führten zu einer signifikanten Verbesserung der Löslichkeit des zu exprimierenden Zielproteins. Des Weiteren wurden keine Unterschiede zwischen der Expression der Fusionsproteine GST-ApoE3 und GST-ApoE4 festgestellt.

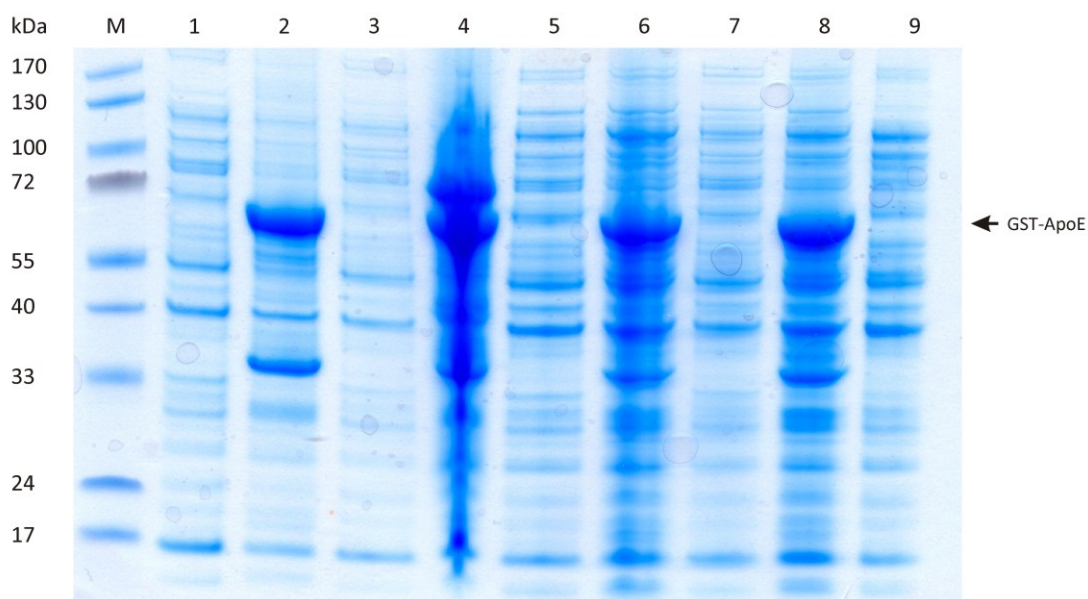


Abbildung 18 | SDS-PAGE – Vergleich zwischen löslicher und unlöslicher Zellfraktion verschiedener *E.-coli*-Expressionsklone nach Coomassiefärbung

Bakterielles Expressionssystem mit N-terminalem GST-Tag, exprimiert bei 37 °C in *E. coli* (BL21(DE3)), Spur 1 – Klon L19-1 (ApoE4) lösliche Fraktion, Spur 2 – Klon L19-1 (ApoE4) unlösliche Fraktion, Spur 3 – Klon L18-8 (ApoE3) lösliche Fraktion, Spur 4 – Klon L18-8 (ApoE3) unlösliche Fraktion, Spur 5 – Klon L15-9 (ApoE4) lösliche Fraktion, Spur 6 – Klon L15-9 (ApoE4) unlösliche Fraktion, Spur 7 – Klon L13-3 (ApoE3) lösliche Fraktion, Spur 8 – Klon L13-3 (ApoE3) unlösliche Fraktion, Spur – 9 Gesamtzellextrakt Klon L15-9 nicht induziert, M – Proteinmarker #SM0671 (Fermentas).

Die erhaltenen GST-ApoE-Fusionsproteine (bakterielles Expressionssystem) konnten mit Hilfe des Western-Blots (Abbildung 19) sowohl in der löslichen als auch in der unlöslichen Zellfraktion nachgewiesen werden. Zum proteinspezifischen Nachweis wurde ein monoklonaler ApoE-Antikörper (178479 Calbiochem) und ein polyklonaler GST-Antikörper (#2622) verwendet. Als Negativkontrolle (Abbildung 19A und B, Spur 5) wurde der Zellextrakt von nicht-induzierten Zellen aufgetragen. Dieser zeigte keine spezifische Reaktion mit dem ApoE-Antikörper. Neben der erwarteten Bande bei 61 kDa waren weitere immunospezifische Reaktionen auf dem Blot zu erkennen, die wahrscheinlich auf Abbauprodukte, Translationsabbrüche bzw. unspezifische Antikörper-Reaktionen mit *E.-coli*-Proteinen zurückzuführen waren. Aus den Ergebnissen von Western-Blot (Abbildung 19A und B) und SDS-PAGE (Abbildung 18) kann man schlussfolgern, dass die Fusionsproteine exprimiert wurden, wobei ein Großteil von GST-ApoE in unlöslicher Form vorlag.

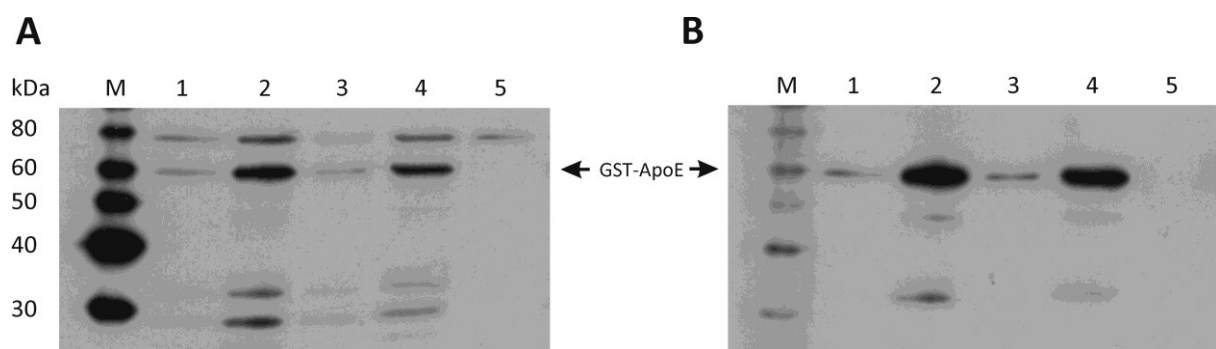


Abbildung 19 | Western-Blot-Nachweis des Fusionsproteins im Zellextrakt mit GST- und ApoE-Antikörpern

(A) GST-Antikörper, Spur 1 – Klon L18-8 (ApoE3) lösliche Fraktion, Spur 2 – Klon L19-1 (ApoE4) lösliche Fraktion, Spur 3 – Gesamtzellextrakt Klon L18-8 (ApoE3), Spur 4 – Gesamtzellextrakt Klon L19-1 (ApoE4), Spur 5 – Kontrolle Gesamtzellextrakt Klon L18-8 (ApoE3) nicht induziert, M – MagicMark™ (Invitrogen), (B) ApoE-Antikörper, gleiche Reihenfolge wie (A).

4.1.2. Reinigungsversuche

Reinigungsversuche des rekombinanten GST-ApoE-Fusionsproteins

Zur Abtrennung und Reinigung des rekombinanten GST-ApoE-Fusionsproteins von *E.-coli*-Proteinen wurden verschiedene Versuche zur Bindung an eine Affinitäts-Matrix durchgeführt. Dazu wurden, wie oben beschrieben, die Zellen in *E. coli* BL21 (DE3) überexprimiert. Nach Induktion mit IPTG wurden die Zellen geerntet und durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Nach Abtrennung der Zelltrümmer erfolgte die Reinigung des GST-Fusionsproteins der löslichen Fraktion mit Hilfe der Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose. Hierbei bindet der Glutathion-S-

Transferase-Fusionsanteil an die Glutathion-Affinitäts-Matrizes und kann mit Hilfe von reduziertem Glutathion wieder verdrängt werden. Die Reinigung erfolgte im *Batch*-Verfahren. Aus den löslichen Zellextrakten konnte gereinigtes GST-ApoE in geringen Mengen gewonnen werden (Abbildung 20A). Die über SDS-PAGE ermittelten apparenten molekularen Massen von 61 kDa entsprachen den erwarteten Werten. Des Weiteren waren in den gewonnen Eluaten (Abbildung 20A, Spur 1-3) Verunreinigungen oder Proteolyseprodukte bzw. durch Translationsabbrüche verkürzte Produkte des Zielproteins zu erkennen. Eine besonders stark gefärbte Bande war unterhalb des Molekulargewichtes von 33 kDa festzustellen (Abbildung 20A, Spur 1-3). Außerdem konnte das Fusionsprotein nicht vollständig von der Affinitäts-Matrix eluiert werden (Abbildung 20A, Spur 4). Wie bereits erwähnt, war nur ein kleiner Anteil des GST-ApoE-Fusionsproteins löslich, fast die Gesamtmenge an gebildetem Protein war in unlöslicher Form vorhanden (Abbildung 20B, Spur 1).

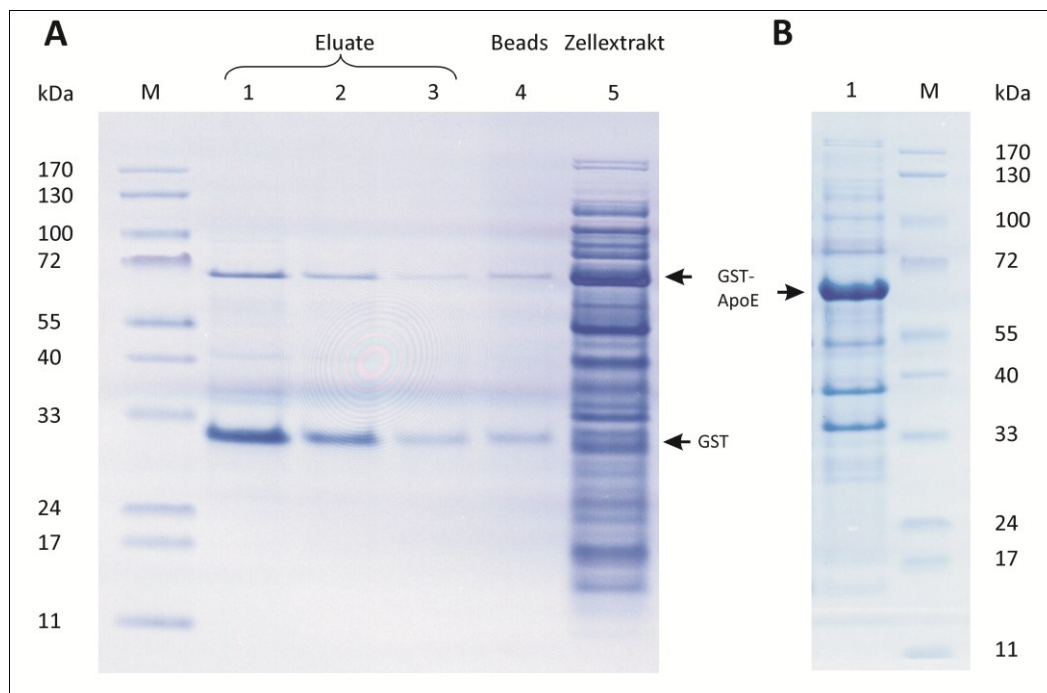


Abbildung 20 | SDS-PAGE – Reinigung von rekombinantem GST-ApoE mit Hilfe der Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen (bakterielles Expressionssystem, pGEX-5T)

(A) Klon L13-3 (ApoE3) Affinitätschromatographie der löslichen Fraktion an Glutathion-Sepharose, Spur 1-3 – Elutionsschritte mit reduziertem Glutathion, Spur 4 – noch an Glutathion-Affinitäts-Matrizes gebundenes Fusionsprotein bzw. Verunreinigungen, Spur 5 – Gesamtzellextrakt (B) Klon L13-3 (ApoE3) unlösliche Fraktion nach Zellyse, M – Proteinmarker SM#0671 (Fermentas).

Aufgrund der Verunreinigung und der geringen Ausbeute des gereinigten Fusionsproteins wurde ein alternatives Expressionssystem (pGEX-6-P1) verwendet. Die mit Hilfe des Plasmides pGEX-6-P1 exprimierten Fusionsproteine (Klone L18-8 und L19-1) besitzen zwischen dem GST-Fusionsteil und dem Zielprotein eine PreScission-Protease-Schnittstelle. Da diese Protease selbst einen GST-Tag aufweist, bindet das Enzym nach Spaltung des Fusionsproteins an freie Stellen der Affinitäts-Matrizes. Damit enthält der Überstand nach Zentrifugation das rekombinant gewonnene ApoE-Protein ohne Fusionsteil und ist nicht mit der Protease verunreinigt. In Abbildung 21 (Spur 1-4) sind erhaltene Überstände nach Reinigung und Proteaseverdau von den Klonen L18-8 und L19-1 abgebildet.

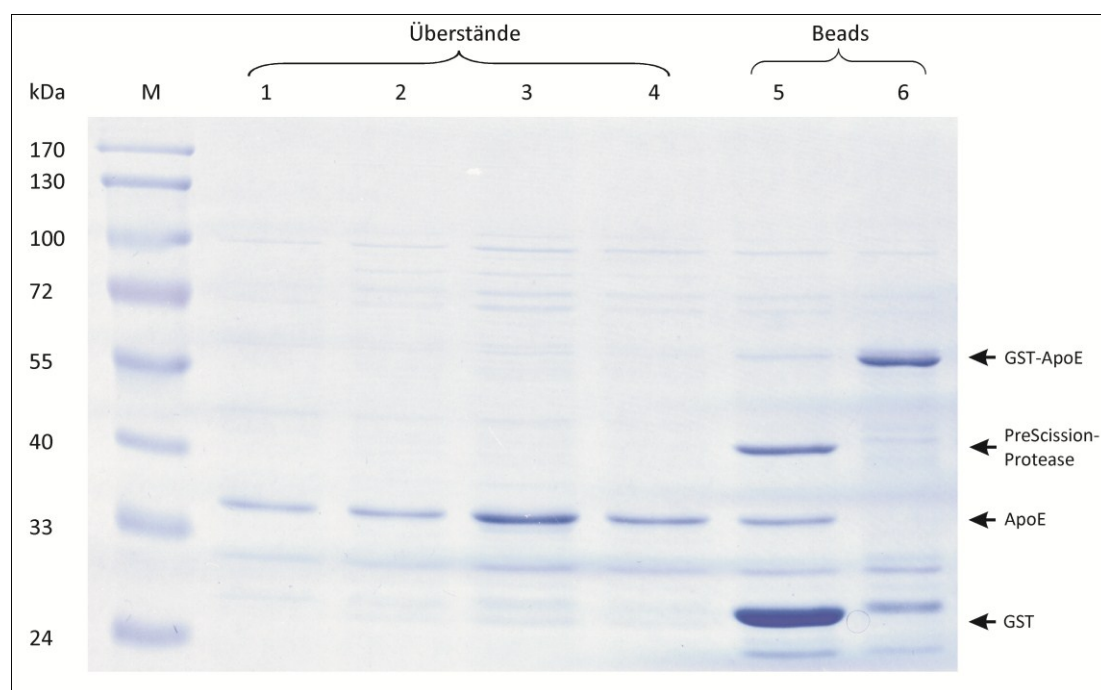


Abbildung 21 | SDS-PAGE – Reinigung von rekombinantem GST-ApoE mit Hilfe der Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen (bakterielles Expressionssystem, pGEX-6-P1)

Spur 1 – Kontrolle Klon L18-8 (ApoE3) Überstand nach PreScission-Proteaseverdau, Spur 2 bis 6 – Klon L19-1 (ApoE4) Affinitätschromatographie der löslichen Fraktion an Glutathion-Sepharose, Spur 2 – Überstand nach 3 h PreScission-Proteaseverdau, Spur 3 – Überstand nach 12 h PreScission-Proteaseverdau, Spur 4 – Waschschritt mit Tris-Puffer, Spur 5 – noch an Glutathion-Affinitäts-Matrizes gebundenes Fusionsprotein, GST-Protein und PreScission-Protease bzw. Verunreinigungen, Spur 6 – an Glutathion-Affinitäts-Matrizes gebundenes Fusionsprotein vor Proteaseverdau, M – Proteinmarker SM#0671 (Fermentas).

Man kann deutlich erkennen, dass nach Proteaseverdau die Größe der Fusionsproteine abnimmt. Dagegen sieht man in Spur 6 noch an Glutathion-Affinitäts-Matrizes gebundenes, noch nicht gespaltenes GST-ApoE-Fusionsprotein (61 kDa), GST-Fusionsteil-Reste (ca. 26 kDa) und PreScission-Protease (ca. 41 kDa). Nach proteolytischer Spaltung waren in den erhaltenen Überständen rekombinantes Apolipoprotein E (L18-8 = ApoE3, L19-9 = ApoE4)

und Verunreinigungen zu erkennen. Zusätzlich konnte im Western-Blot (Abbildung 22) spezifische Antikörper-Protein-Reaktionen zur Bestätigung des Reinigungsversuches gezeigt werden. Die hier gezeigte heterologe Expression von Apolipoprotein E4 in *E. coli* BL21 (DE3) mit anschließender Reinigung und Spaltung (SDS-PAGE Abbildung 21, dazugehöriger Western-Blot Abbildung 22) ergab eine Ausbeute von 58 µg Protein aus 1,3 g Feuchtgewicht Bakterien (entsprach 600 ml Kulturvolumen).

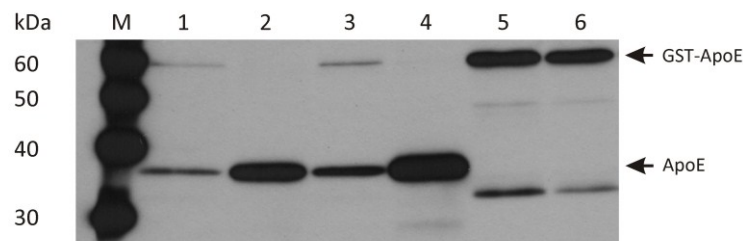


Abbildung 22 | Western-Blot-Nachweis von rekombinantem ApoE nach Reinigung und Spaltung mit PreScission-Protease mit ApoE-Antikörpern

(A) Spur 1 – Klon L18-8 (ApoE3) Glutathion-Affinitäts-Matrizes nach Proteaseverdau, Spur 2 – Klon L19-1 (ApoE4) Glutathion-Affinitäts-Matrizes nach Proteaseverdau, Spur 3 – Klon L18-8 (ApoE3) Überstand nach Proteaseverdau, Spur 4 – Klon L19-1 (ApoE4) Überstand nach Proteaseverdau, Spur 5 – Kontrolle Zellextrakt Klon L18-8 (ApoE3), Spur 6 – Kontrolle Zellextrakt Klon L19-1 (ApoE4), M – MagicMark™ (Invitrogen).

Heterologe Proteinexpression in *Saccharomyces cerevisiae* und Reinigungsversuche

Alternativ wurde außerdem versucht, die GST-ApoE-Fusionsproteine in *S. cerevisiae* zu überexprimieren. Wie bereits gezeigt, konnte das Fusionsprotein im Zellextrakt von *S. cerevisiae* (Abbildung 17A) nachgewiesen werden. Ähnlich wie im bakteriellen Expressionssystem sind nur geringe Mengen rekombinanten Proteins in der löslichen Fraktion zu finden. Ein Großteil geht als unlösliches Sediment verloren. Der Zellwandaufbau aus Peptidoglycan-Schichten bei Hefen erschwert den Zellaufschluss. Dieser erfolgte nach Induktion in einer French-Press-Zelle. Anschließend wurde dann versucht, mit Hilfe von Affinitätschromatographie (Glutathion-Sepharose) gereinigtes rekombinantes GST-ApoE-Fusionsprotein aus der löslichen Fraktion zu gewinnen. Es konnten jedoch nur geringe Mengen werden. Eine Auswertung mit Hilfe der SDS-PAGE war aufgrund der geringen Proteinkonzentration nicht möglich (Daten nicht gezeigt). Mit Hilfe des Western-Blots (Abbildung 23) konnten Expression (Spur 9) und Reinigung (Spur 1 und 2) nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich deutlich, dass der Großteil des Zielproteins als unlösliche Fraktion vorlag (Spur 3 und 4). Des Weiteren wurde versucht unlösliche Bestandteile durch

Verwendung von nicht-ionischen Detergenzien (Triton® X-100, Methyl- β -cyclodextrin) in Lösung zu bringen (Spur 5 bis 8).

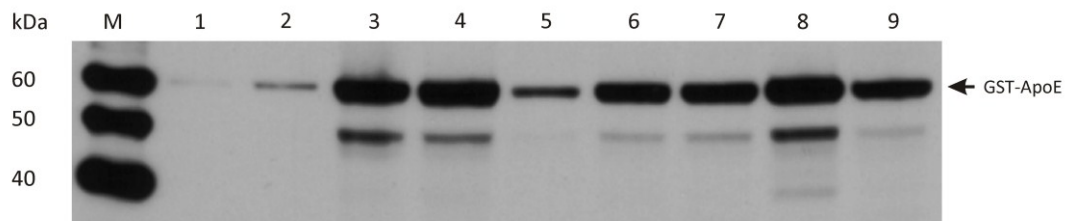


Abbildung 23 | Western-Blot-Nachweis des Fusionsproteins nach Reinigung mit GST-Antikörpern

S. cerevisiae Klon 7.2 (ApoE3), Spur 1 – Elutionsschritt 1 mit reduziertem Glutathion, Spur 2 – Elutionsschritt 2 mit reduziertem Glutathion, Spur 3 – unlösliche Fraktion nach Zentrifugation (10 min 10.000 x g), Spur 4 – unlösliche Fraktion nach Zentrifugation (10 min 20.000 x g), Spur – 5, 6 unlösliche Fraktionen mit Methyl- β -cyclodextrin behandelt, zentrifugiert (16.000 x g) und lösliche Fraktionen aufgetragen, Spur 7,8 – unlösliche Fraktionen mit 1 % (V/V) Triton® X-100 behandelt und lösliche Fraktionen aufgetragen, Spur 9 – löslicher Zellextrakt nach verschiedenen Zentrifugationsschritten, M – MagicMark™ (Invitrogen).

4.1.3. Solubilisierungsversuche

Solubilisieren mit Triton® X-100

Zur Isolierung der Proteine aus der unlöslichen Fraktion bzw. Einschlusskörpern (bakterielles Expressionssystem) wurden diese mit Triton® X-100, einem nicht-ionischen Tensid, behandelt und die solubilisierten Proteine anschließend durch Zentrifugation von anderen unlöslichen Bestandteilen abgetrennt. Zur Entfernung des störenden Tensids wurden die Proteine mit Ammoniumsulfat stufenweise ausgefällt und nach Aufnahme in PBS-Puffer (unter Zusatz von Proteaseinhibitoren und Ammoniumhydrogencarbonat, Kapitel 3.2.3.) zur Erniedrigung der hohen Salzkonzentration gegen PBS-Puffer (300 mM NH_4HCO_3) dialysiert. Das gewonnene Dialysat wurde anschließend zur Analyse auf eine SDS-PAGE aufgetrennt. Es konnte keine signifikante Menge Fusionsprotein mittels Coomassiefärbung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Denaturierende Reinigung über Ni-Chelat-Säule

Als weitere Möglichkeit zur Reinigung der unlöslichen Fusionsproteine wurde eine Affinitätschromatographie von His-getaggen ApoE-Proteinen unter denaturierenden Bedingungen in Betracht gezogen. Dabei wird die native Konformation des Proteins zerstört. Da der Expressionsklon L15-9 (ApoE4) das Fusionsprotein mit einem N-terminalen His-Tag exprimiert, war es möglich, das zuvor in Guanidiniumhydrochlorid-haltigem Puffer gelöste aggregierte Apolipoprotein E über eine Ni-Chelat-Säule zu reinigen. Zur Kontrolle der

Reinigung wurden Proben mit TCA präzipitiert und eine SDS-PAGE durchgeführt (Abbildung 24). Die Elution des Fusionsproteins erfolgte bei pH = 4,5 (Spur 10 bis 13). Dabei konnte in mehreren Elutionsfraktionen Hexahistidin-Fusionsprotein angereichert werden. Die Renaturierung des erhaltenen Fusionsproteins mit Hilfe verschiedener Protokolle führte nicht zum Erfolg.

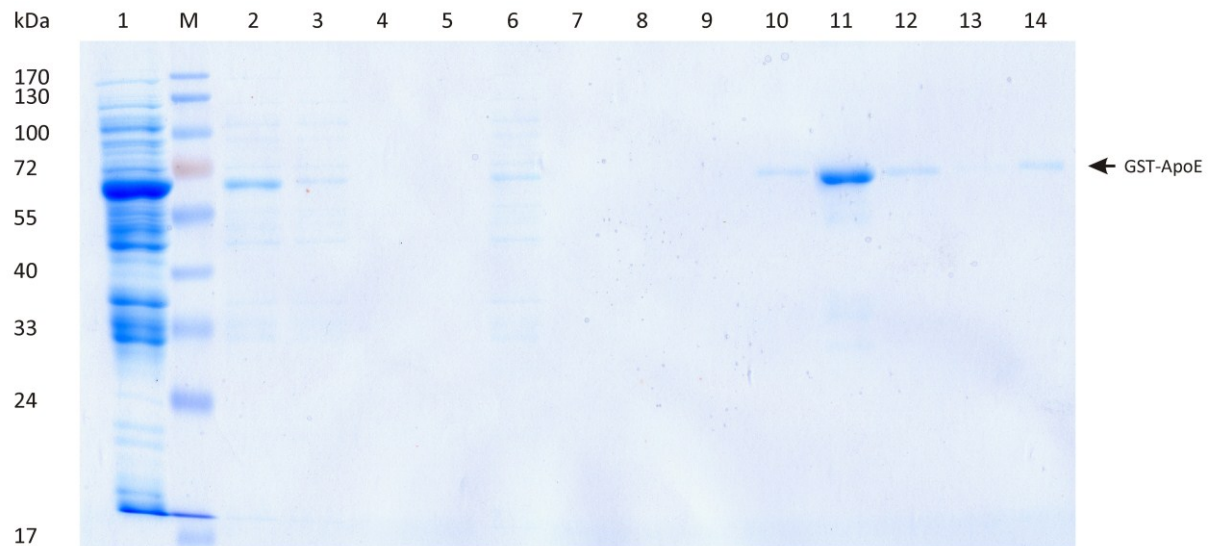


Abbildung 24 | SDS-PAGE – Denaturierender Reinigungsversuch von aggregiertem ApoE

Spur 1 – Klon L15-9 (ApoE4) unlösliche Zellfraktion, Spur 2 – mit Guanidinchlorid-haltigem Puffer aufgelöste Probe, Spur 3 – Überstand nach binden an Ni-NTA-Säule, Spur 4, 5 – Überstand der Waschschrte, Spur 6, 7, 8, 9 – Elutionsschritte (pH = 5,9), Spur 10, 11, 12, 13 – Elutionsschritte (pH = 4,5), Spur 14 – noch an Ni-NTA-Affinitäts-Matrizes gebundenes Protein.

4.1.4. Apolipoprotein-E-Peptid-induzierte Toxizität (ApoE-Peptid-Assay)

Denaturierungsstudien zeigen Unterschiede hinsichtlich der Proteolyseanfälligkeit der ApoE-Isoformen. Aus ApoE4 durch Proteolyse entstandene Fragmente scheinen eine Rolle für pathologische Veränderungen im Gehirn zu spielen (Harris *et al.* 2003). In *In-Vitro*-Studien von Moulter *et al.* (1999) konnte eine neurotoxische Wirkung von dimeren ApoE-Peptiden an sympathischen (*Ganglion cervicale superius*) und hippocampalen Neuronen bereits gezeigt werden.

Aufgrund der Tatsache, dass ein Aufbau eines Assays mit rekombinat hergestelltem Apolipoprotein E4 sowohl in einem Hefeexpressionssystem als auch in einem bakteriellen Expressionssystem nicht möglich war, wurde deshalb versucht ein Assay mit einem synthetisch hergestellten ApoE-Peptid aufzubauen, um ein geeignetes Alzheimer-Test-Modell zu etablieren.

Ziel der Durchführung des Assays war es, einen Hinweis auf neuroprotektive Effekte von Extrakten und Substanzen gegenüber der ApoE-Peptid-induzierten Toxizität auf SH-SY5Y-Neuroblastomzellen zu bekommen. Die Zellviabilität diente hierbei als Maß für die Bestimmung der Toxizität des Peptids und erfolgte kolorimetrisch mit Hilfe des MTT-Farbstoffes in einem Mikrotiterplatten-basierenden Assay (Kapitel 3.2.4.2).

Das synthetisch hergestellte ApoE-Tandem-Peptid (Aminosäuresequenz (141-155)²: LRKLRLRLRDADDLLRKLRLRLRDADDL) zeigte eine signifikante toxische Wirkung an SH-SY5Y Zellen ($CC_{50, 24h} = 54 \mu M$; Abbildung 25).

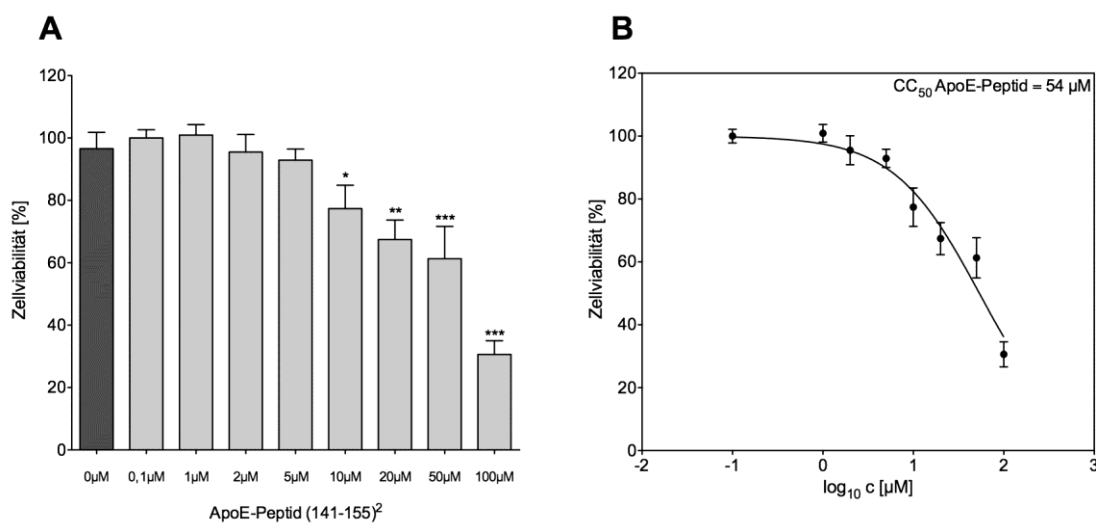


Abbildung 25 | ApoE-Peptid-Toxizität nach 24 h

(A) konzentrationsabhängige Toxizität in SH-SY5Y nach 24 h Inkubation (Student's *t*-Test vs 100%-Kontrolle (K) (entspricht 0,5 % DMSO Endkonzentration); $n = 3$; $\bar{x} \pm SD$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$); (B) $CC_{50} = 50$ % Zellviabilität.

Um neuroprotektive Effekte von Extrakten und Substanzen untersuchen zu können, wurden diese in entsprechenden Konzentrationen zugegeben und mit 50 μM ApoE-Peptid co-inkubiert. Aus der ermittelten Abnahme der Zellviabilität konnten Rückschlüsse auf neuroprotektive Eigenschaft von Extrakten und Substanzen gewonnen werden. Zur Charakterisierung des ApoE-Peptid-Assays wurden folgende Extrakten und Substanzen getestet: der methanolische *Cynomorium*-Extrakt (TCM-Extrakt 7M, Kapitel 4.2.2.2.) und der methanolische *Pipturus*-Extrakt (Pflanzenextrakt 2766-1.9C der Vanuatu-Wildsammlung, Kapitel 4.2.2.3.), die Sephadex-Fraktion C4 (aktivitätsgeleitete Fraktionierung des methanolischen *Pipturus*-Extraktes Kapitel 4.2.2.4.) und die homobivalenten β -Carbolin-Derivate **15d** und **24a** (Kapitel 4.2.2.1.). Diese waren bereits im NMDA-Assay aufgrund ihrer

antagonistischen Aktivität am NMDA-Rezeptor aufgefallen. Um mögliche Kompensationseffekte erkennen und beurteilen zu können, wurde die Zellviabilität ohne ApoE-Peptid Co-Inkubation bestimmt (Abbildung 26A). Dabei zeigte sich, dass der *Cynomorium*-Extrakt (Viabilität (50 µg/ml) = 114 %) und die Sephadex-Fraktion C4 (Viabilität (50 µg/ml) = 140 %) die metabolische Aktivität der SH-SY5Y-Zellen erhöhte. Im Gegensatz dazu zeigten die β -Carbolin-Derivate **15d** (Viabilität = 83 %) und **24a** (Viabilität = 78 %) bei einer Konzentration von 50 µM leichte cytotoxische Effekte. Diese konnten ebenfalls auch an nicht-neuronalen L(tk)-Zellen beobachtet werden (**15d**, Viabilität_{50 µM} = 76 %; **24a**, Viabilität_{50 µM} = 79 %) und scheinen somit nicht zellspezifisch zu sein. Hingegen hatte der methanolische *Pipturus*-Extrakt keinen großen Einfluss auf die Zellviabilität, der Wert lag nahe der DMSO-Kontrolle.

Ein ähnliches Bild (Abbildung 26B) ergibt sich mit Co-Inkubation des ApoE-Peptides (50 µM) für 24 h. Berücksichtigt man die Effekte der Substanzen und Extrakte auf die Viabilität der Zelle bei alleiniger Inkubation (Abbildung 26A), kann bei einer Co-Inkubation mit dem ApoE-Peptid zwar keine vollständige Verminderung der Peptid-induzierten Toxizität beobachtet werden, trotzdem zeigten die methanolischen *Cynomorium*- und *Pipturus*-Extrakte sowie die Sephadex-Fraktion C4 des *Pipturus*-Extraktes einen protektiven Effekt. Hingegen waren keine protektiven Effekte nach Inkubation der ApoE-geschädigten SH-SY5Y-Neuroblastomzellen mit den Reinsubstanzen **15d** (Viabilität = 33 %) und **24a** (Viabilität = 22 %) zu erkennen. Die Zellviabilität reduzierte sich deutlich unter Zugabe der Reinsubstanzen. Offenbar handelt es sich hierbei um einen additiven Effekt, wobei sich die cytotoxische Wirkung der Substanzen selbst und die Peptid-induzierte Toxizität summieren.

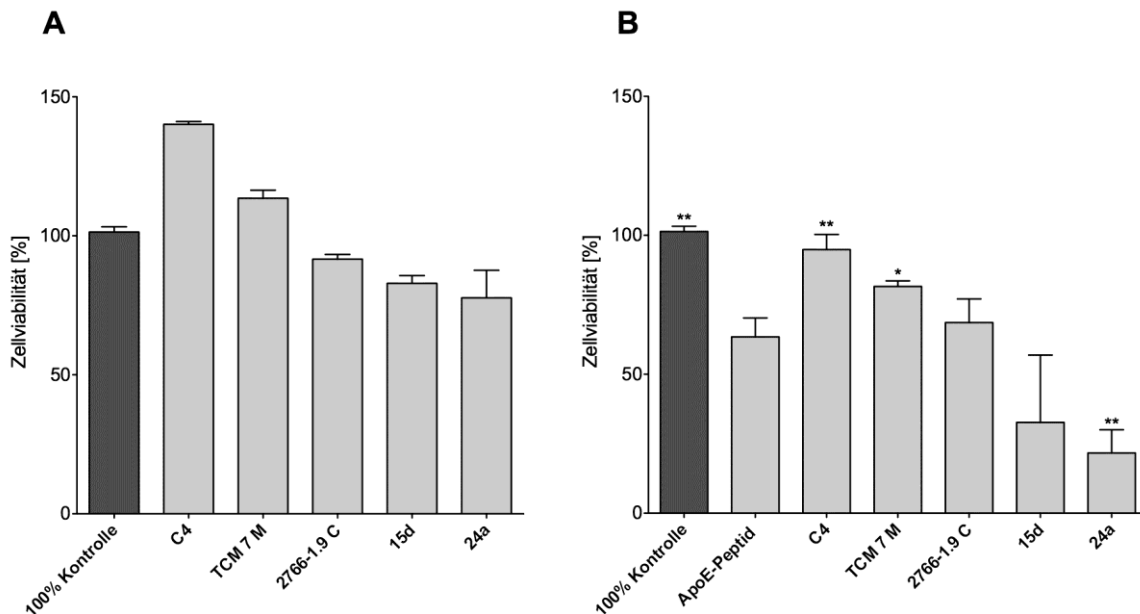


Abbildung 26 | ApoE-Peptid-Toxizität im Vergleich

(A) Zellviabilität nach 24 h Inkubation von Extrakten (50 µg/ml) und Substanzen (50 µM) in SH-SY5Y-Zellen, 100%-Kontrolle = 0,1% DMSO; (B) ApoE-Peptid-Toxizität (50 µM) bei Co-Inkubation (24 h) mit Extrakten (50 µg/ml) und Substanzen (50 µM) in SH-SY5Y-Zellen, 100%-Kontrolle = 0,35 % DMSO; (Student's *t*-Test vs ApoE-Peptid; n= 3; \bar{x} + SD; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.2. N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor-vermittelte Exzitotoxizität (NMDA-Assay)

Der NMDA-Rezeptor ist für neuronale Adaptionsvorgänge wie Lernprozesse und Gedächtnisbildung essentiell. Die physiologische, kurzzeitige Freisetzung des Neurotransmitters L-Glutamat bildet eine wichtige Grundlage für diese Prozesse. Bei neurodegenerativen Hirnerkrankungen wie der Alzheimerschen Krankheit sind Freisetzung und Aufnahme von L-Glutamat im ZNS gestört. Dadurch befinden sich unphysiologisch hohe Konzentration im synaptischen Spalt, woraus eine Überstimulation des NMDA-Rezeptors resultiert. Dieser Vorgang einer Glutamat-vermittelten übermäßigen Exzitation (Erregung) mit nachfolgender Zellschädigung (Toxizität) durch Ca^{2+} -Einstrom wird als Exzitotoxizität bezeichnet (Rothman und Olney 1987). Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Mikrotiterplatten-basierender Assay aufgebaut werden, um damit Pflanzenextrakte und chemisch definierte Reinsubstanzen auf ihre antagonistische Wirkung am NMDA-Rezeptor zu untersuchen. Der mögliche therapeutische Nutzen solcher Substanzen bei neurodegenerativen Erkrankungen beruht dabei auf der Reduktion der Glutamat-vermittelten Exzitotoxizität.

4.2.1. Aufbau, Charakterisierung und Validierung des Testsystems

Für die Bestimmung der antagonistischen Aktivität von Substanzen bzw. Extrakten am NMDA-Rezeptor wurden zwei transgene murine Fibroblasten-Zelllinien (L12-G10 und L13-E6) verwendet. Diese wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Dieter Steinhilber (Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt am Main) und von MSD (MSD SHARP & DOHME GmbH) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich dabei um Subzelllinien, die ursprünglich aus L(tk-)-Zellen hervorgegangen waren. Diese Zellen wurden mit den Expressionsvektoren pMSG NR1-1a/pMSG NR2A bzw. pMSG NR1-1a/pMSG NR2B stabil co-transfiziert im Verhältnis 1:5 (NR1:NR2) und exprimieren humane cDNAs der Untereinheiten NR1-1a/NR2A (L12-Zellen) und NR1-1a/NR2B (L13-Zellen) des NMDA-Rezeptors. Die Regulation der Rezeptor-Expression erfolgte durch Zugabe des Induktors Dexamethason und wurde über ein *glucocorticoid responsive element* vermittelt. Aufgrund der Tatsache, dass auch ohne Zugabe des Induktors eine basale Expression des Rezeptors stattfand und das Zellkulturmedium L-Glutamat und Glycin enthielt, war Ketamin ein Grundbestandteil des Mediums, um NMDAR-vermittelte cytotoxische Effekte zu unterdrücken. Des Weiteren besitzen die Zellen zusätzlich eine G418-Resistenz zur Selektion (Grimwood *et al.* 1996, Steinmetz *et al.* 2002).

Zum Nachweis der Expression des NMDA-Rezeptors wurde der polyklonale Antikörper Anti-NMDAR1 verwendet. Dieser reagiert spezifisch mit der Rezeptoruntereinheit NR1 des NMDA-Rezeptors. Wie man deutlich in Abbildung 27 erkennen kann, wurden in den Zelllinien L12-G10 und L13-E6 nach Dexamethason-Behandlung NMDA-Rezeptoren exprimiert. Bei den untransfizierten Wildtypzellen (L(tk-)) und bei den Proben aus L12- und L13-Zellen ohne Dexamethason-Behandlung wurde keine NR1-Proteinbande detektiert.

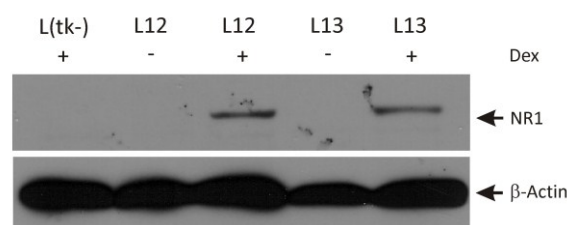


Abbildung 27 | Western-Blot-Nachweis von NR1 in induzierten, nicht induzierten Klonen und in Wildtyp-Zellen mit monoklonalem Maus Antikörper anti-NR1

Behandlung der Zellen mit 4 µM Dexamethason (+) und ohne Dexamethason (-), Aliquots von Gesamtprotein von L(tk-)-Wildtyp-Zellen, Zelllinien L12-G10 und L13-E6; Zellextrakte wurden auf Zellzahl normiert; Ladekontrolle erfolgte mit Anti-β-Actin (C4).

Die Durchführung des NMDA-Assays (Ablauf des NMDA Assays siehe Abbildung 28, genaue Durchführung siehe Kapitel 3.2.4.1.) erfolgte in einer 96well-Mikrotiterplatte mit 10.000 Zellen/well. Nach 24-stündiger Inkubation wurde durch Wechsel des Kulturmediums die Rezeptor Expression durch Zugabe von Dexamethason induziert. Nach weiterer 16-stündiger Inkubation erfolgte das dreimalige Waschen der Zellen mit phenolrotfreiem MEM mit 1 % (m/V) BSA bzw. nur mit phenolfreiem MEM, um im Medium enthaltenes Ketamin möglichst vollständig zu entfernen. Anschließend wurden Testsubstanzen bzw. Extrakte zugegeben. Die Proben wurden so angeordnet, dass senkrechte, benachbarte wells die gleiche Probe enthielten. Dabei wurde außerdem beachtet, dass keine Probe nur am Rand oder nur in der Mitte positioniert war. So sollte eine Beeinflussung der Testergebnisse durch „Randeffekte“ auf ein Minimum reduziert werden (Rasmussen und Nielsen 2002).

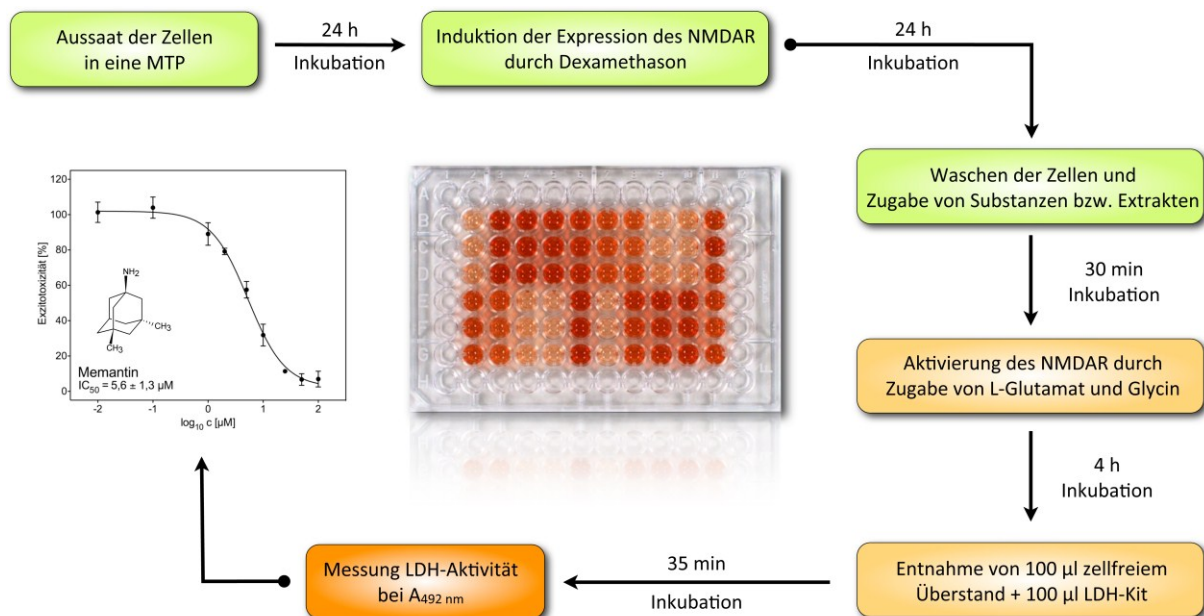


Abbildung 28 | Schematischer Ablauf des NMDA-Assays

Die NMDAR-vermittelte Exzitotoxizität wurde nach 30-minütiger Vorkinkubation der Testsubstanzen durch Zugabe von L-Glutamat und des Co-Agonisten Glycin induziert. Der Rezeptorionenkanal wird geöffnet und die Zellen aufgrund eines dadurch erhöhten Ca²⁺-Ioneneinstroms geschädigt (Glutamat-vermittelte Exzitotoxizität).

Die Bestimmung der Exzitotoxizität erfolgte kolorimetrisch anhand der aus den geschädigten Zellen freigesetzten cytoplasmatischen Lactatdehydrogenase. Die gebildete Menge an Formazan ist dabei direkt proportional zur LDH-Aktivität. Die Basislinie von 0 %

Exzitotoxizität wurde definiert als LDH-Freisetzung bei Stimulation des Rezeptorionenchannels mit L-Glutamat, Glycin und gleichzeitiger Blockade durch 100 μ M Ketamin. Umgekehrt wurde 100 % Exzitotoxizität definiert als LDH-Freisetzung bei Stimulation durch die Agonisten in Abwesenheit von Ketamin. Gemessene Werte über 100 % könnten prinzipiell durch cytotoxische Aktivität von Substanzen und Extrakten hervorgerufen werden. Dagegen könnten Werte unter 0 % auf eine stärkere Blockade des Rezeptors als mit Ketamin (100 μ M) hinweisen.

Um den möglichen Einfluss von Extrakten und Substanzen auf die Reduktion des Tetrazoliumsalzes zu bestimmen, wurden Substanzkontrollen der jeweiligen Proben mitgeführt. Die Probelösungen wurden hierbei ohne Zellen analog gemessen. Die so ermittelte „Eigenabsorption“ wurde bei der Berechnung der Exzitotoxizitätswerte berücksichtigt.

Darüber hinaus wurden aktive Testsubstanzen bzw. Extrakte in Hinblick auf direkte LDH-Inhibition untersucht. Gemessene Werte unter 100 % könnten prinzipiell auf eine direkte LDH-Inhibition im Überstand hindeuten und würden die Ergebnisse des NMDA-Assays verfälschen. Dazu wurden Zellen, wie bereits beschrieben, behandelt, jedoch ohne Stimulation durch L-Glutamat und Glycin. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 1 % Triton® X-100 vollständig lysiert und die LDH-Aktivität im Vergleich zu den Kontrollen bestimmt. Bei keiner der getesteten Substanzen bzw. Extrakte konnte eine signifikante LDH-Inhibition beobachtet werden (siehe Anhang Tabelle 19).

Validierung des Testsystems mit Ketamin, Memantin, MK-801, Spermin und Spermidin

Zur funktionellen Charakterisierung des NMDA-Assays wurde einerseits der Einfluss der NMDAR-Agonisten L-Glutamat und Glycin untersucht und andererseits zur Validierung des Assays die Aktivitäten der bekannten NMDAR-Antagonisten Ketamin, Memantin und MK-801 bestimmt.

Transgene L(tk-)-Zellen, die nach Zugabe des Induktors Dexamethason die NMDAR-Untereinheiten exprimierten und mit L-Glutamat und Glycin behandelt wurden (Abb. 29C, Kontrolle 1), zeigten im Vergleich zu nicht-induzierten Zellen (Abb. 29B, Kontrolle 1) bzw. untransfizierten Zellen (Abb. 29A, Kontrolle 1) eine signifikant höhere Zellschädigungsrate. Diese Glutamat-induzierte Exzitotoxizität wurde durch Zugabe bereits bekannter NMDA-Antagonisten Ketamin und Memantin effektiv gehemmt (Abb. 29C). Mit dem NMDA-Assay

können somit potentiell neue NMDAR-selektive Verbindungen und Extrakte identifiziert werden, die die Glutamat-induzierte Exzitotoxizität hemmen. Darüber hinaus konnte eine erhöhte Zellschädigung bei den transfizierten L(tk-) Zellen unter Dexamthason-Behandlung (Abb. 29C, Kontrolle 2) im Vergleich zu untransfizierten Zellen (Abb. 29A, Kontrolle 2) beobachtet werden. Vermutlich verursachte die Bildung des Rezeptorionenkanals eine verstärkte Zellschädigung in Abwesenheit der Agonisten L-Glutamat und Glycin (Ligand-unabhängiger „Leerstrom“). Des Weiteren konnte in transfizierten L(tk-) Zellen ohne Zugabe des Induktors Dexamethason (Abb. 29B), aber in Anwesenheit der Agonisten L-Glutamat und Glycin (Kontrolle 1) eine leicht erhöhte Zellschädigung im Vergleich zur Kontrolle 2 (ohne Agonisten) beobachtet werden. Wahrscheinlich wurden aufgrund einer basalen Expression des Rezeptors (ohne Induktor) die Zellen bereits leicht geschädigt. Durch Zugabe von 100 μ M Ketamin oder 20 μ M Memantin konnte diese erhöhte Zellschädigung verhindert werden (Abb. 29B).

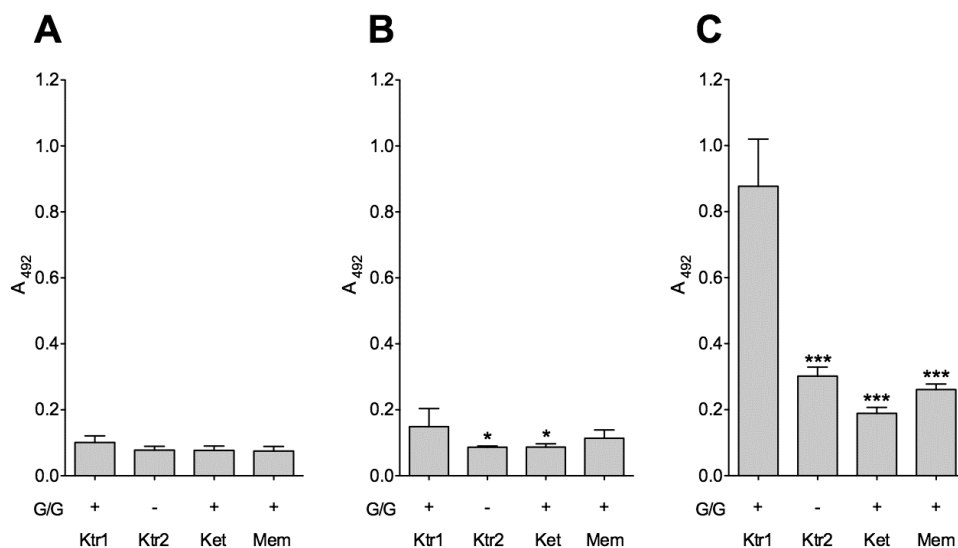


Abbildung 29 | NMDAR-vermittelte Exzitotoxizität

(A) L(tk-) Zellen kultiviert mit 4 μ M Dexamethason und behandelt mit 100 μ M Ketamin (Ket), 20 μ M Memantin (Mem), NMDAR Aktivierung mit 10 μ M Glutamat und 10 μ M Glycin (G/G), Kontrolle 1 mit G/G (Ktr1), Kontrolle 2 ohne G/G (Ktr2); (B) L12-G10 Zellen kultiviert ohne Dexamethason und behandelt analog zu A; (C) L12-G10 Zellen kultiviert mit 4 μ M Dexamethason und behandelt analog zu A (Student's *t*-Test Kontrolle 1 (mit 10 μ M G/G) vs Kontrolle 2 (ohne G/G); *n* = 3; \bar{x} + SD; * *p* < 0,05; ** *p* < 0,01; *** *p* < 0,001).

Zur Validierung des NMDA-Assays wurden die Aktivitäten der bereits bekannten NMDAR-Antagonisten Ketamin, Memantin und MK-801 bestimmt und zusätzlich der Einfluss der modulierend wirkenden Verbindungen Spermin und Spermidin untersucht.

Alle drei Rezeptor-Antagonisten schützten im getesteten Konzentrationsbereich bis 100 μM die NMDAR-exprimierenden Zellen vor der Glutamat-vermittelten Zellschädigung. Es gab keine Unterschiede hinsichtlich selektiver Wirkung in Abhängigkeit von der Rezeptor-Zusammensetzung. Die ermittelten halbmaximalen Hemmkonzentrationen (IC_{50}) sind in Abbildung 30 dargestellt. Ketamin (L12: $\text{IC}_{50} = 6,1 \mu\text{M}$, L13: $\text{IC}_{50} = 3,2 \mu\text{M}$) und Memantin (L12: $\text{IC}_{50} = 5,6 \mu\text{M}$, L13: $\text{IC}_{50} = 5,5 \mu\text{M}$) waren etwa 1000-fach schwächer wirksam als MK-801 (L12: $\text{IC}_{50} = 8,1 \text{ nM}$, L13: $\text{IC}_{50} = 11,9 \text{ nM}$). Diese Ergebnisse konnten in unabhängigen Experimenten reproduziert werden und zeigen damit, dass der NMDA-Assay als valide angesehen werden kann. Es war möglich, die in der Literatur (siehe Tabelle 10) beschriebenen inhibitorischen Effekte der Referenzsubstanzen Ketamin, Memantin und MK-801 am NMDA-Rezeptor in den transgenen Zelllinien L12 (NR1/NR2A) und L13 (NR1/NR2B) in vergleichbaren Konzentrationsbereichen zu reproduzieren.

Tabelle 10 | Inhibitorische Aktivität am NMDA-Rezeptor der Referenzsubstanzen im Vergleich zur Literatur

NMDAR-Antagonist	NMDAR-Inhibition IC_{50} [μM]					
	NMDA-Assay ¹		Steinmetz <i>et al.</i> 2002 ²		Dravid <i>et al.</i> 2007 ³	
	NR1/NR2A	NR1/NR2B	NR1/NR2A	NR1/NR2B	NR1/NR2A	NR1/NR2B
Ketamin	6,1	3,2	14,4	14,9	3,31	0,93
Memantin	5,6	5,5	n.b.	n.b.	4,36	1,2
(+)-MK-801	0,008	0,012	n.b.	n.b.	0,015	0,009

¹Bestimmung der NMDAR-Aktivität erfolgte kolorimetrisch anhand aus den geschädigten Zellen freigesetzten cytoplasmatischen Lactatdehydrogenase, Aktivierung des NMDAR durch Zugabe von jeweils 10 μM L-Glutamat/Glycin

²Bestimmung der NMDAR-Aktivität erfolgte kolorimetrisch anhand aus den geschädigten Zellen freigesetzten cytoplasmatischen Lactatdehydrogenase, Aktivierung des NMDAR durch Zugabe von jeweils 30 μM L-Glutamat/Glycin

³Bestimmung der NMDAR-Aktivität durch Patch-Clamp-Methode (Spannungsmessung), Aktivierung des NMDAR durch Zugabe von 50 μM L-Glutamat und 30 μM Glycin

Um cytotoxische Wirkungen der Referenzsubstanzen an der transgenen L12-Zelllinie auszuschließen, wurde die Zellviabilität mit Hilfe des MTT-Assays bestimmt. Im Konzentrationsbereich bis 100 μM konnten keine nennenswerten cytotoxischen Effekte nach 24-stündiger Inkubation (Zellviabilität > 98 %, Daten nicht gezeigt) im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (0,1 % DMSO) beobachtet werden.

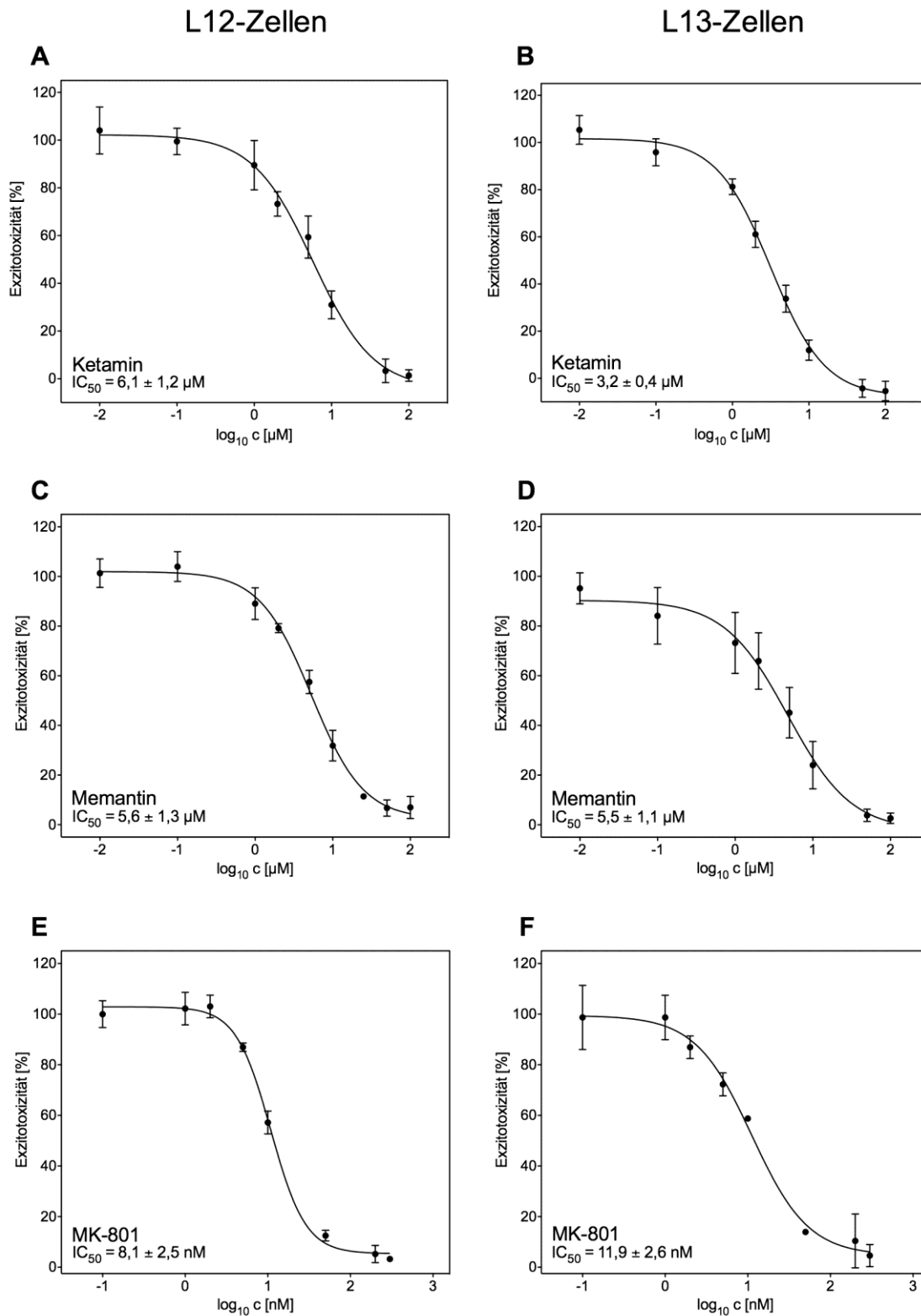


Abbildung 30 | Inhibitionskurven von Ketamin, Memantin und MK-801

(A) Ketamin an L12-Zellen; (B) Ketamin an L13-Zellen; (C) Memantin an L12-Zellen; (D) Memantin an L13-Zellen; (E) MK-801 an L12-Zellen; (F) MK-801 an L13-Zellen gemessen.

Polyamine wie Spermin und Spermidin wirken modulierend auf den NMDA-Rezeptor. Ihnen werden vielfältige Effekte zu gesprochen, dazu zählen in niedrigen Konzentrationen verstärkende, in höheren Konzentrationen inhibierende Eigenschaften (Benveniste und Mayer 1993). Die Stimulation kann sowohl Glycin-abhängig erfolgen als auch Glycin-unabhängig und ist außerdem abhängig von der Rezeptorzusammensetzung. Darüber hinaus können eine spannungsabhängige Blockade des Rezeptors und eine Modulation der Agonisten-Bindung (Glutamat) durch Spermin resultieren (Williams 1997).

In unseren Experimenten führte die Behandlung mit Spermin und Spermidin in dem getesteten Konzentrationsbereich bis 100 μM an L12-Zellen zu keiner signifikanten Erhöhung bzw. Reduktion der gemessenen Exzitotoxizität (Abbildung 31A). Lediglich bei 100 μM Spermin konnte eine leichte aber statistisch signifikante Erhöhung der Exzitotoxizität an L13-Zellen (Abbildung 31B) festgestellt werden.

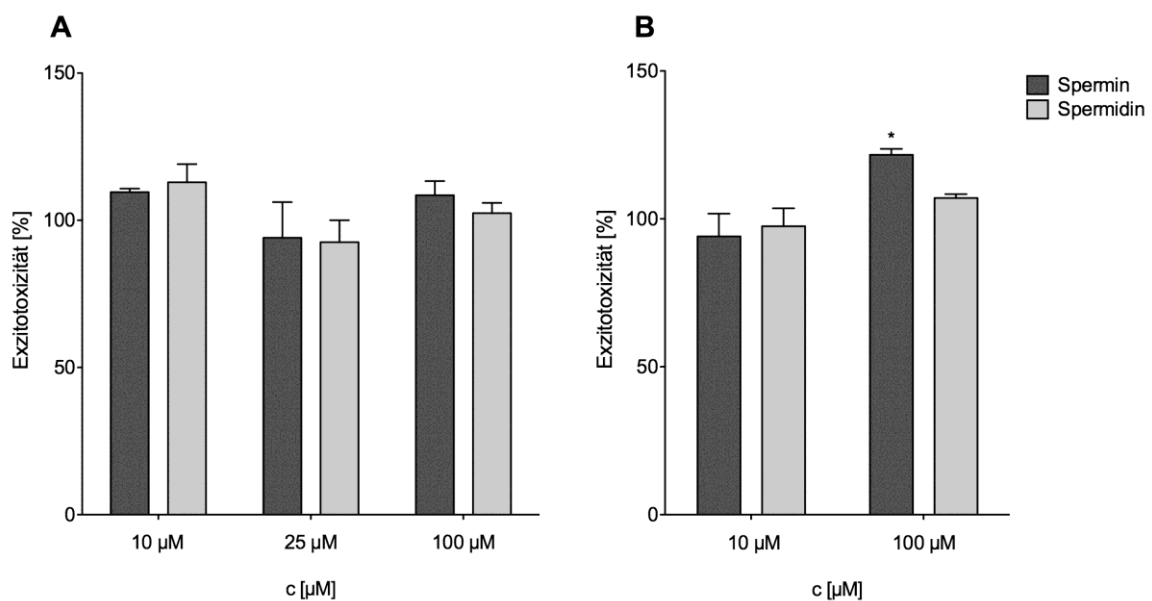


Abbildung 31 | Aktivität von Spermin und Spermidin am NMDAR

(A) L12-Zellen; (B) L13-Zellen; Assay-Bedingungen: 10 μM L-Glutamat/Glycin in Zellkulturmedium bei pH 8,1; Inkubation 4 h; (Student's *t*-Test vs 100%-Exzitotoxizitäts-Kontrolle; $n = 3$; $\bar{x} \pm \text{SD}$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.2.2. Screening nach inhibitorischer Aktivität am NMDA-Rezeptor

4.2.2.1. Reinsubstanzen

Es wurden im NMDA-Assay 105 Reinsubstanzen aus der Substanzbibliothek des Lehrstuhls für Pharmazeutische Chemie von Prof. Dr. Jochen Lehmann (Institut für Pharmazie, Friedrich-Schiller-Universität Jena) getestet. Außerdem wurden weitere Substanzen von Prof. Dr. Jörg Heilmann (Institut für Pharmazie, Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Universität Regensburg) und Prof. Dr. Bernhard Wunsch (Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Universität Münster) zur Verfügung gestellt. Neben den Cholinesteraseinhibitoren Rivastigmin, Galantamin, Tacrin sowie Tacrin-Derivaten wurden weitere potentielle AChE-Inhibitoren (β -Carbolin-Derivate), Statine, Derivate des nichtsteroidalen Antirheumatikums Flurbiprofen, 3-Benzazepin-Derivate, diverse Naturstoffe sowie das in Bärlappgewächsen vorkommende Huperzin A getestet.

β -Carbolin-Derivate

Die β -Carbolin-Derivate (Verbindungen **6** bis **25**) wurden in einem Initialscreening mit einer Konzentration von 25 μ M hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirkung am NMDA-Rezeptor an L12-Zellen und ausgewählte Verbindungen an L13-Zellen untersucht (Tabelle 11). Jeder der ermittelten Werte wurde in drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 6 Parallelen bestimmt.

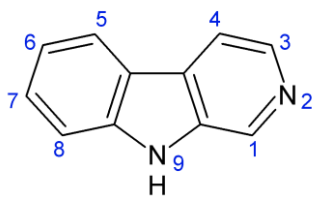


Abbildung 32 | Grundstruktur der β -Carboline mit Nummerierung

Keine der untersuchten monovalenten β -Carboline (**6-6d**, **7-7d**, **8-8a**, **9-9d**, **10-10d**, **11**, **12**, **13**, **14-14a**, Abbildung 33) zeigten im Initialscreening eine signifikante inhibitorische Wirkung (Hemmung der Exzitotoxizität < 20 %) am NMDA-Rezeptor mit NR2A-Untereinheit, mit Ausnahme der schwach wirksamen Verbindungen **6e** (30 % Hemmung) und **10d** (20 % Hemmung). Eine Bromierung an Position C-6 schien für antagonistische Aktivität am Rezeptor günstiger zu sein als Methoxylierung bzw. fehlende Substitution. Die N-2-homobivalenten β -Carboline (**15-15j**), dargestellt in Abbildung 34, zeigten ab einer

Spacerlänge von 6 Methylengruppen NMDAR-inhibitorische Aktivität (Abbildung 37). Besonders aktiv waren die Verbindungen **15d**, **15f** und **15j** mit einer Hemmung > 85 %. Die Einführung einer Methoxy- (**18**) oder einer Hydroxygruppe in Position C-6 bei einer Spacerlänge von $n = 5$ führte im Vergleich zur unsubstituierten Verbindung **15c** zu leicht erhöhten Exzitotoxizitäts-Werten (ca. 15 %), also zu einer Verminderung der Wirksamkeit. Des Weiteren zeigten die N-2-homobivalenten β -Carbolin-Derivate **16** mit starrem p-Xylyl-Spacer und **17** mit einem Ethoxy-Spacer weitaus geringere inhibitorische Aktivitäten (Hemmung < 40 %) als die Verbindungsgruppe **15** mit Methylengruppen-Spacer. Für die Verbindung **20**, ein heterobivalentes Derivat, und das homobivalente Pyridinium-Derivat (**21**) konnten keine signifikanten inhibitorischen Wirkungen beobachtet werden. Offenbar führte der Austausch des größeren β -Carbolin-Ringsystems gegen einen bzw. zwei Pyridin-Ringe zu einem vollständigen Aktivitätsverlust (Hemmung < 13 %, $c = 25 \mu\text{M}$). Für die Wechselwirkung mit dem Rezeptor scheint ein größeres aromatisches Ringsystem notwendig zu sein.

Tabelle 11 | Inhibitorische Aktivität am NMDA-Rezeptor und Zellviabilität getesteter β -Carbolin-Derivate

CC₅₀ 50 % Zellviabilität; CC₅₀ > 100 μ M entspricht > 50 % Zellviabilität bei 100 μ M; CC₅₀ > 50 μ M entspricht > 50 % Zellviabilität bei 50 μ M; CC₅₀ < 50 μ M entspricht < 50 % Zellviabilität bei 50 μ M; n= 3-5; \pm SD

Chiffre	NMDAR-Inhibition Exzitotoxizität [%] \pm SD bei 25 μ M (IC ₅₀ [μ M] \pm SD)		Zellviabilität [%] \pm SD bei 50 μ M (CC ₅₀ [μ M])
	L12-G10	L13-E6	L12-G10
6	82,2 \pm 1,1 (n. b.)	57,5 \pm 8,5 (n. b.)	90,4 \pm 2,7 (> 100)
6a	91,7 \pm 7,6 (n. b.)	68,8 \pm 0,2 (n. b.)	88,3 \pm 3,1 (> 100)
6b	97,9 \pm 2,5 (n. b.)	82,0 \pm 3,5 (n. b.)	65,9 \pm 3,2 (> 100)
6c	99,6 \pm 0,9 (n. b.)	n. b. (n. b.)	68,9 \pm 16,6 (> 50)
6d	100,8 \pm 2,0 (n. b.)	n. b. (n. b.)	81,1 \pm 4,3 (> 50)
6e	70,3 \pm 2,4 (n. b.)	n. b. (n. b.)	77,3 \pm 10,3 (> 50)
7	92,3 \pm 7,7 (n. b.)	75,4 \pm 9,7 (n. b.)	98,6 \pm 2,1 (> 100)
7a	100,2 \pm 8,2 (n. b.)	n. b. (n. b.)	93,4 \pm 9,8 (> 50)
7b	88,0 \pm 8,7 (n. b.)	n. b. (n. b.)	83,6 \pm 7,8 (> 50)
7c	94,5 \pm 3,1 (n. b.)	n. b. (n. b.)	93,4 \pm 9,8 (> 50)
7d	99,0 \pm 2,3 (n. b.)	n. b. (n. b.)	95,0 \pm 6,0 (> 50)
8	124,0 \pm 5,5 (n. b.)	n. b. (n. b.)	98,0 \pm 3,7 (> 50)
8a	92,2 \pm 3,5 (n. b.)	77,6 \pm 5,1 (n. b.)	93,5 \pm 2,6 (> 50)
9	96,4 \pm 2,2 (n. b.)	94,4 \pm 1,5 (n. b.)	96,3 \pm 1,4 (> 50)
9a	102,9 \pm 8,3 (n. b.)	n. b. (n. b.)	93,8 \pm 9,0 (> 50)
9b	99,9 \pm 4,2 (n. b.)	n. b. (n. b.)	100,9 \pm 9,5 (> 100)
9c	139,6 \pm 7,0 (n. b.)	121,0 \pm 3,9 (n. b.)	1,8 \pm 0,5 (< 50)
9d	93,8 \pm 6,9 (n. b.)	n. b. (n. b.)	97,2 \pm 2,1 (> 50)
10	94,0 \pm 4,2 (n. b.)	54,2 \pm 5,3 (n. b.)	87,6 \pm 5,7 (> 100)
10a	95,8 \pm 8,6 (n. b.)	89,7 \pm 3,1 (n. b.)	82,6 \pm 3,1 (> 100)
10b	87,5 \pm 8,2 (n. b.)	n. b. (n. b.)	88,5 \pm 3,9 (> 100)
10c	92,8 \pm 8,5 (n. b.)	n. b. (n. b.)	86,6 \pm 3,8 (> 50)
10d	80,1 \pm 6,7 (n. b.)	n. b. (n. b.)	61,8 \pm 2,6 (> 50)

Fortsetzung Tabelle 11 |

Chiffre	NMDAR-Inhibition Exzitotoxizität [%] \pm SD bei 25 μ M (IC ₅₀ [μ M] \pm SD)		Zellviabilität [%] \pm SD bei 50 μ M (CC ₅₀ [μ M])
	L12-G10	L13-E6	L12-G10
11	114,2 \pm 7,2 (n. b.)	n. b. (n. b.)	n. b. (n. b.)
12	103,1 \pm 6,1 (n. b.)	n. b. (n. b.)	75,4 \pm 5,1 (> 50)
13	101,0 \pm 9,9 (n. b.)	n. b. (n. b.)	85,5 \pm 3,3 (> 50)
14	97,3 \pm 1,8 (n. b.)	93,6 \pm 1,8 (n. b.)	98,8 \pm 0,1 (> 50)
14a	99,7 \pm 1,7 (n. b.)	95,9 \pm 10,5 (n. b.)	95,5 \pm 0,7 (> 100)
15	83,6 \pm 10,2 (n. b.)	85,2 \pm 1,9 (n. b.)	76,6 \pm 4,9 (> 100)
15a	43,8 \pm 9,5 (24,8 \pm 7,4)	40,5 \pm 14,5 (17,3 \pm 4,9)	82,5 \pm 5,0 (> 100)
15b	70,1 \pm 2,5 (n. b.)	88,5 \pm 0,3 (n. b.)	78,2 \pm 8,1 (> 100)
15c	49,7 \pm 1,5 (20,5 \pm 6,1)	16,3 \pm 1,5 (24,8 \pm 7,4)	92,4 \pm 7,3 (> 100)
15d	2,1 \pm 1,7 (2,2 \pm 0,6)	15,0 \pm 3,9 (6,5 \pm 0,5)	75,7 \pm 2,2 (> 100)
15e	11,5 \pm 2,5 (6,1 \pm 1,5)	31,0 \pm 5,5 (17,8 \pm 5,2)	80,1 \pm 4,1 (> 100)
15f	3,6 \pm 2,8 (3,5 \pm 2,4)	7,5 \pm 2,0 (7,5 \pm 2,0)	51,8 \pm 7,2 (54,2 \pm 3,7)
15g	28,2 \pm 12,5 (13,5 \pm 5,6)	30,4 \pm 0,9 (12,3 \pm 3,2)	73,8 \pm 8,6 (> 100)
15h	10,4 \pm 2,1 (9,1 \pm 1,4)	8,6 \pm 4,0 (5,9 \pm 2,7)	67,5 \pm 8,8 (> 100)
15i	15,5 \pm 2,7 (5,1 \pm 0,8)	36,0 \pm 12,1 (10,7 \pm 0,7)	60,3 \pm 6,1 (> 100)
15j	2,6 \pm 0,6 (2,6 \pm 1,1)	6,3 \pm 1,4 (1,8 \pm 0,7)	38,0 \pm 12,6 (35,1 \pm 15,2)
16	58,3 \pm 6,4 (n. b.)	76,3 \pm 10,5 (n. b.)	83,2 \pm 3,2 (> 100)
17	80,1 \pm 8,8 (60,9 \pm 6,9)	89,3 \pm 3,5 (n. b.)	98,6 \pm 3,5 (> 100)
18	61,2 \pm 4,0 (29,4 \pm 2,5)	65,3 \pm 4,4 (n. b.)	84,1 \pm 3,4 (> 100)
19	63,2 \pm 9,6 (22,7 \pm 6,3)	75,8 \pm 2,1 (n. b.)	71,8 \pm 7,9 (> 100)
20	87,0 \pm 4,2 (n. b.)	92,3 \pm 6,7 (n. b.)	98,2 \pm 5,6 (> 100)
21	103,0 \pm 7,7 (n. b.)	92,0 \pm 3,4 (n. b.)	99,8 \pm 3,7 (> 50)
22	104,2 \pm 7,7 (n. b.)	124,2 \pm 0,8 (n. b.)	0,2 \pm 0,5 (< 50)
22a	103,6 \pm 6,5 (n. b.)	101,4 \pm 11,6 (n. b.)	77,3 \pm 11,4 (> 50)

Fortsetzung Tabelle 11 |

Chiffre	NMDAR-Inhibition Exzitotoxizität [%] \pm SD bei 25 μ M (IC ₅₀ [μ M] \pm SD)		Zellviabilität [%] \pm SD bei 50 μ M (CC ₅₀ [μ M])
	L12-G10	L13-E6	
23	74,7 \pm 5,4 (n. b.)	90,5 \pm 1,4 (n. b.)	74,9 \pm 6,5 (> 50)
23a	92,6 \pm 4,3 (n. b.)	111,3 \pm 4,0 (n. b.)	67,7 \pm 4,0 (> 100)
23b	91,8 \pm 9,1 (n. b.)	97,6 \pm 1,7 (n. b.)	100,2 \pm 5,0 (> 100)
24	69,7 \pm 7,5 (n. b.)	100,3 \pm 2,3 (n. b.)	90,9 \pm 2,6 (> 50)
24a	-1,5 \pm 1,8 (1,4 \pm 0,2)	4,4 \pm 2,4 (2,9 \pm 1,1)	78,9 \pm 7,4 (> 100)
24b	12,1 \pm 3,8 (4,4 \pm 0,4)	24,8 \pm 7,1 (5,6 \pm 0,1)	52,9 \pm 3,7 (33,8 \pm 14,0)
25	91,0 \pm 11,0 (n. b.)	89,3 \pm 10,2 (n. b.)	83,4 \pm 27,3 (> 50)

Eine weitere untersuchte Gruppe von homobivalenten β -Carbolin-Derivaten sind über den Indolstickstoff (N-9) verknüpft. Für die Derivate **23-23b** wurden nur geringe Aktivitäten (Hemmung < 25 %, c = 25 μ M) ermittelt. Im Gegensatz zu den Derivaten **24a** und **24b** führte die Quaternisierung (Position N-2) zu einer starken Reduktion der Exzitotoxizität (Hemmung > 80 %, c = 25 μ M). Wie schon bei den N-2-verknüpften homobivalenten Derivaten scheint für die Aktivität die Spacerlänge wichtig zu sein. Derivat **24** (n = 5) besitzt im Vergleich zu **24a** (n = 9) und **24b** (n = 12) nur eine geringe inhibitorische Aktivität am NMDAR (Hemmung = 30 %, c = 25 μ M). Die partiell reduzierten, nicht quaternäre Derivate **22**, **22a** und **25** zeigten nur sehr geringe Aktivitäten (Hemmung < 10 %, c = 25 μ M).

Für die aktivsten Verbindungen **15d**, **24a** und **24b** (Konzentrationsbereich von 0,01 μ M bis 100 μ M) sind Hemmkurven in Abbildung 35 dargestellt. Dabei zeigten diese Verbindungen eine dosisabhängige, ab einer Konzentration von 1 μ M statistisch signifikante Reduktion der Exzitotoxizität im Vergleich zur Kontrolle. Die ermittelten IC₅₀-Werte für die Verbindungen **15d** (L12: IC₅₀ = 2,2 μ M, L13: IC₅₀ = 6,5 μ M), **24a** (L12: IC₅₀ = 1,4 μ M, L13: IC₅₀ = 2,9 μ M) und **24b** (L12: IC₅₀ = 4,4 μ M, L13: IC₅₀ = 5,6 μ M) sind mit den Werten von Memantin (L12: IC₅₀ = 5,6 μ M, L13: IC₅₀ = 5,5 μ M) vergleichbar.

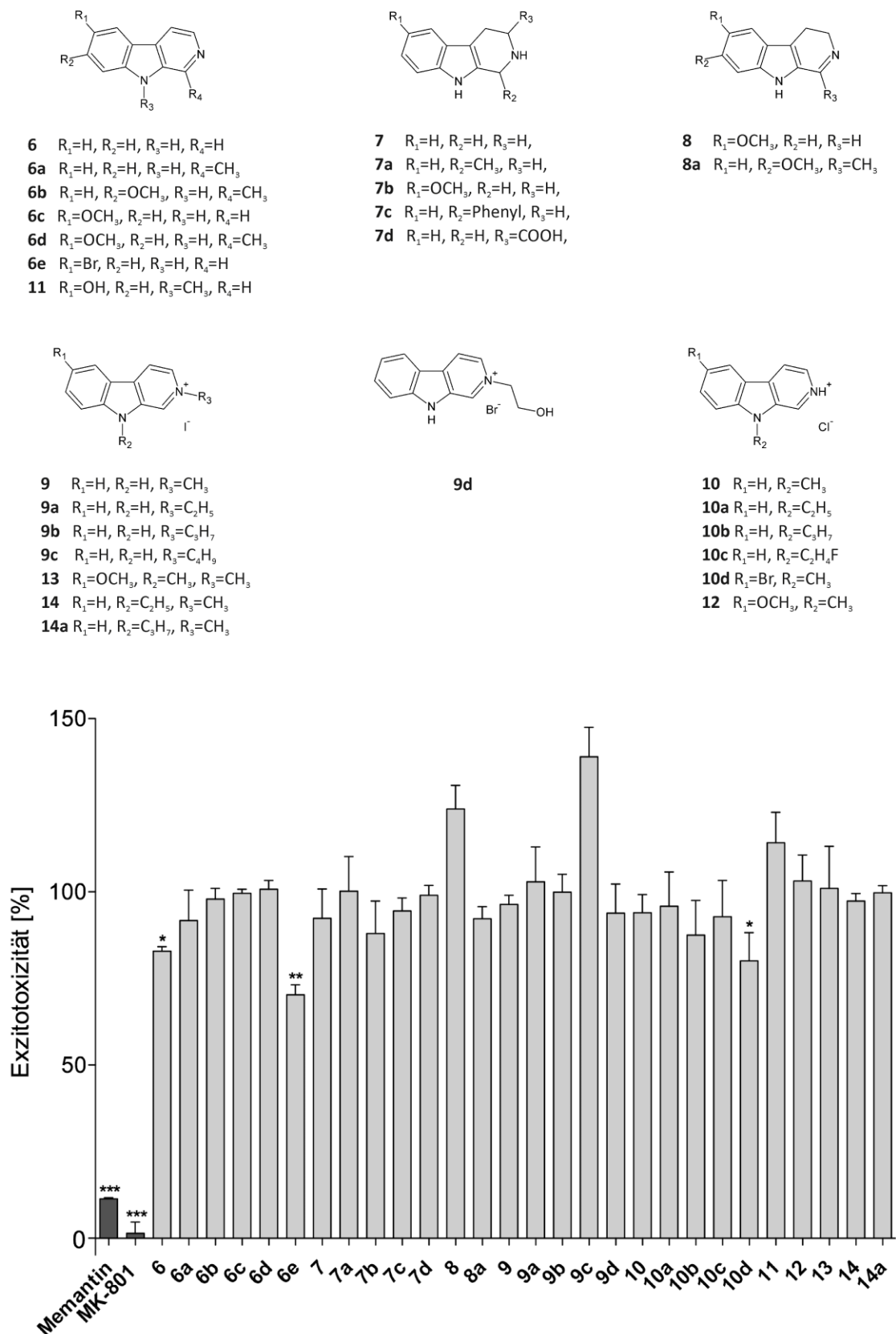


Abbildung 33 | Ergebnisse des Initialscreenings der β -Carboline-Derivate am NMDAR (L12-Zellen)

Alle Verbindungen wurden bei einer Konzentration von $c = 25 \mu M$ getestet, Ausnahme MK-801 $c = 300 \text{ nM}$; (Student's t -Test vs 100%-Exzitotoxizitäts-Kontrolle; $n = 3-5$; $\bar{x} \pm SD$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

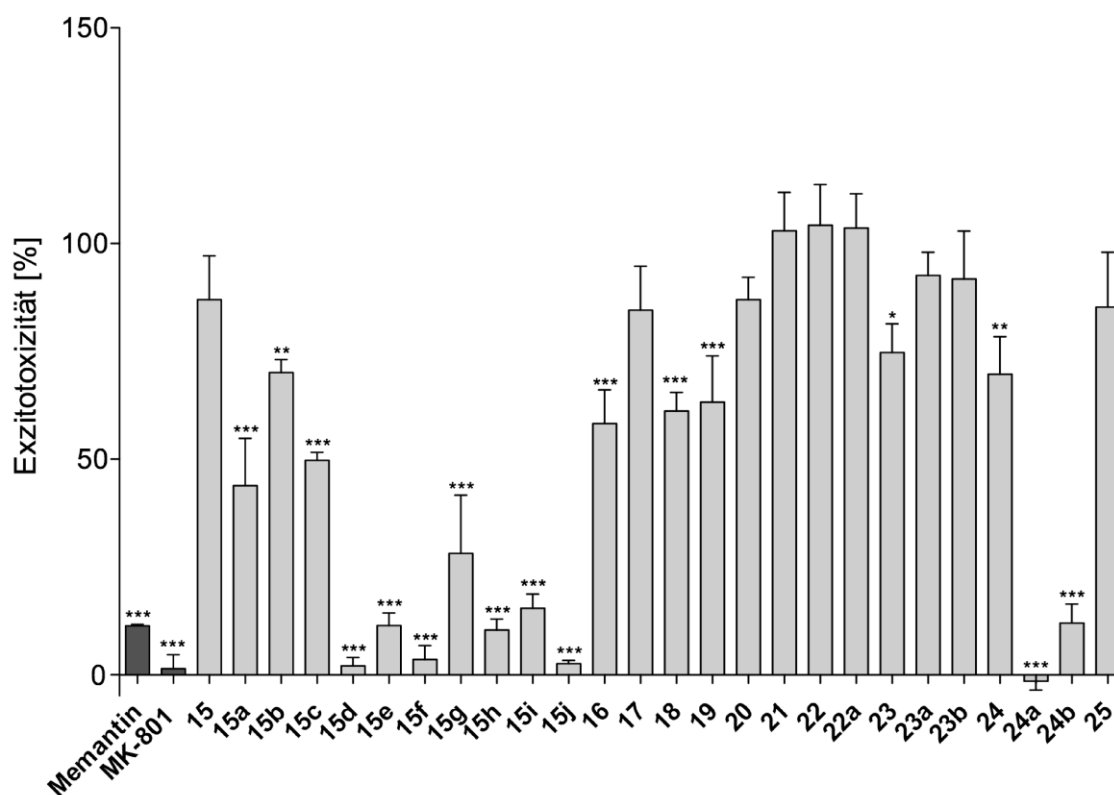
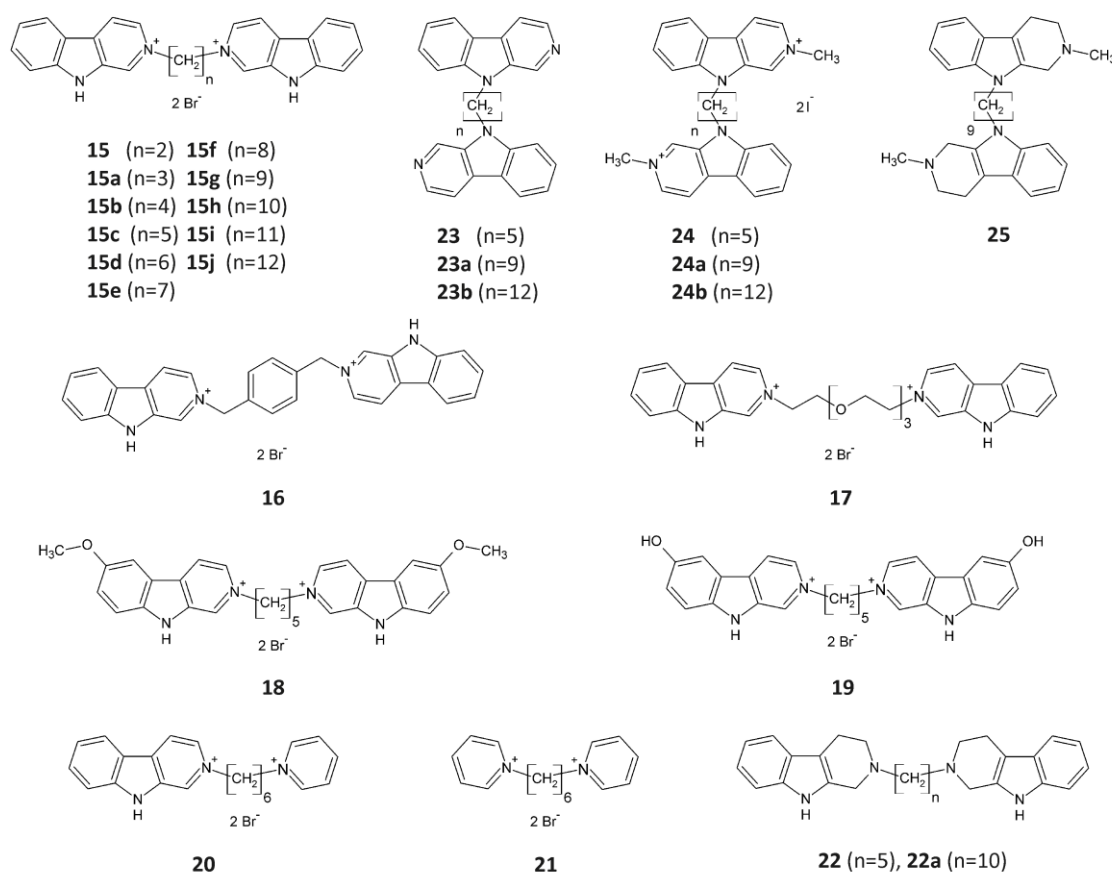
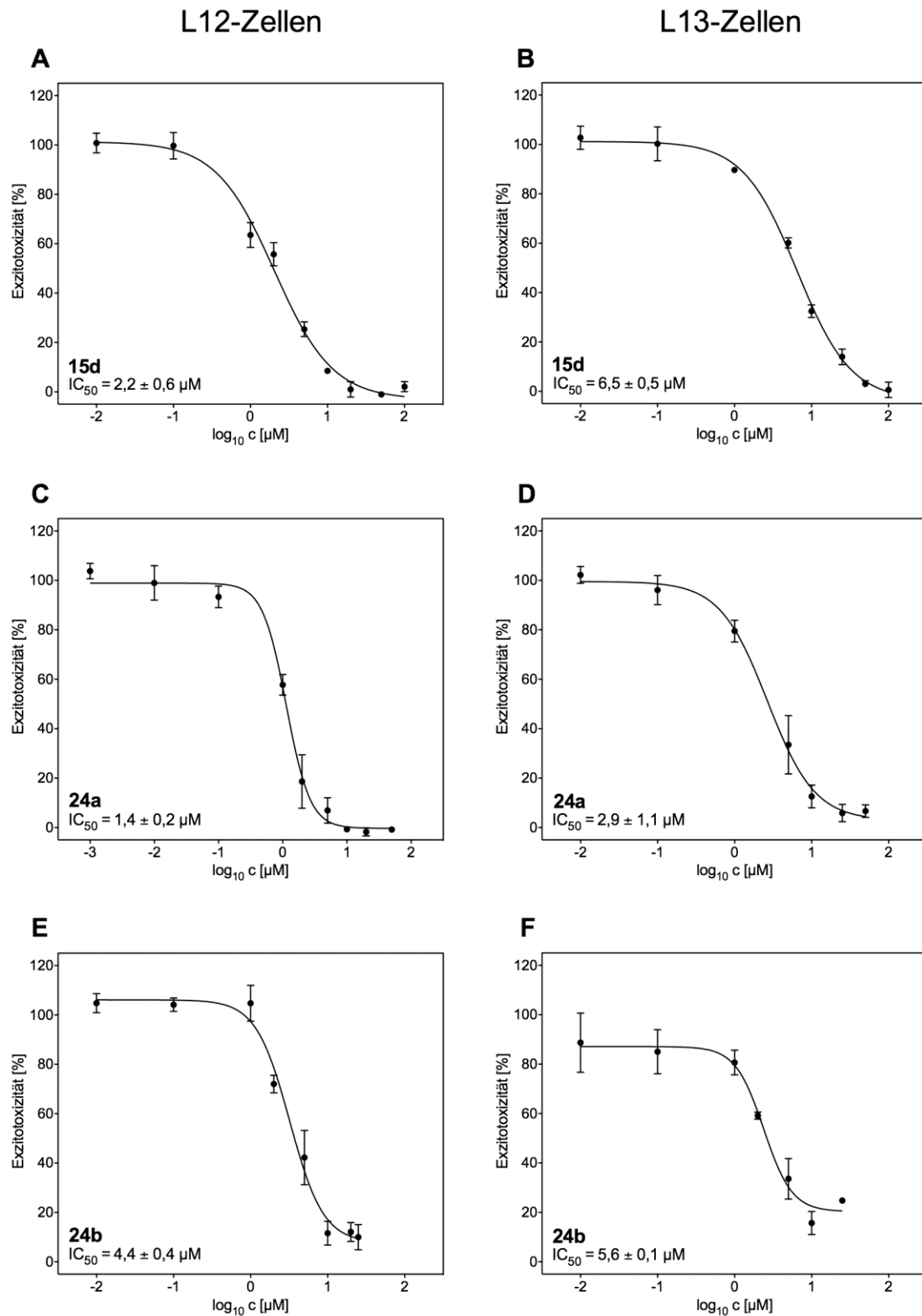


Abbildung 34 | Ergebnisse des Initialscreenings bivalenter β -Carboline-Derivate am NMDAR (L12-Zellen)

Alle Verbindungen wurden bei einer Konzentration von $c = 25 \mu\text{M}$ getestet, Ausnahme MK-801 $c = 300 \text{ nM}$; (Student's t -Test vs 100%-Exzitotoxizitäts-Kontrolle; $n = 3-5$; $\bar{x} \pm \text{SD}$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Abbildung 35 | Inhibitionskurven ausgewählter aktiver β -Carbolin-Derivate

(A) 15d (L12); (B) 15d (L13); (C) 24a (L12); (D) 24a (L13); (E) 24b (L12); (F) 24b (L13)

Für ausgewählte Verbindungen (**6**, **6a**, **6b**, **7**, **8a**, **9**, **9c**, **10**, **14-14a**, **15-15j**, **16**, **17**, **18**, **19**, **20**, **21**, **22-22a**, **23-23b**, **24-24b**, **25**) wurde zusätzlich die inhibitorische Aktivität an L13-Zellen hinsichtlich selektiver Wirkung am NMDAR untersucht. Nur bei einigen Verbindungen, dargestellt in Abbildung 36, konnten signifikante Unterschiede beobachtet werden. Verbindung **10** zeigte mit einer Differenz von 39,8 % ($p < 0,001$) den deutlichsten Unterschied. Jedoch war aber die Gesamtaktivität im Vergleich zu Memantin immer noch deutlich schlechter (Mem, Abbildung 36). Norharman (**6**), Harman (**6a**), Harmin (**6b**) sowie die Verbindungen **8a**, **15d**, **15e**, **15i**, **24** und **24a** zeigten geringere aber noch statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$). Hingegen konnte bei den Verbindungen **7**, **16** und **24b** keine statistisch signifikanten Unterschiede beobachtet werden.

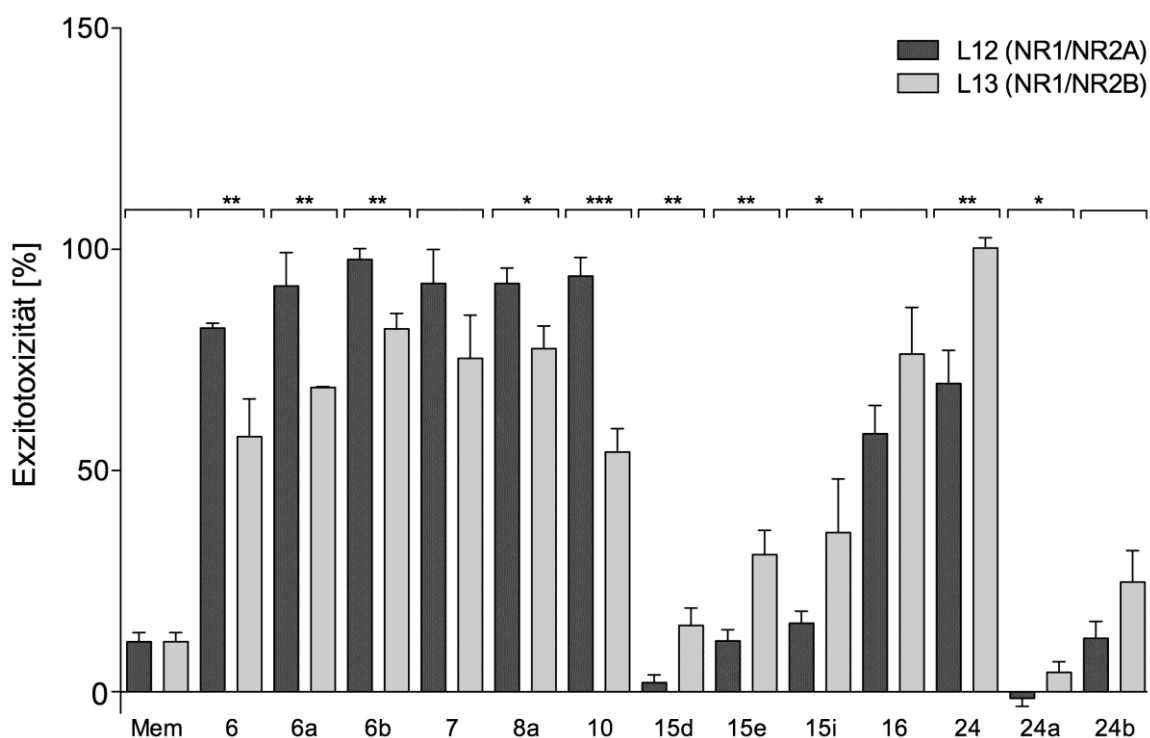


Abbildung 36 | Vergleich der inhibitorischen Aktivität am NMDAR an L12- und L13-Zellen ausgewählter β -Carboline-Derivate

Alle Verbindungen wurden bei einer Konzentration von $c = 25 \mu\text{M}$ getestet; Mem - Memantin (Student's t -Test L12- vs L13-Zellen; $n = 3-5$; $\bar{x} + \text{SD}$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Auch für β -Carboline-Derivate wurde der Einfluss auf die Zellviabilität an L12-Zellen untersucht. Dabei zeigten die Verbindungen **22** ($\text{CC}_{50} = 0,2 \mu\text{M}$) und **9c** ($\text{CC}_{50} = 1,8 \mu\text{M}$) nach jeweils 24-stündiger Inkubation starke Toxizität. Des Weiteren konnten bei den Verbindungen **15j** ($\text{CC}_{50} = 35,1 \mu\text{M}$), **15f** ($\text{CC}_{50} = 54,2 \mu\text{M}$) und **24b** ($\text{CC}_{50} = 33,8 \mu\text{M}$) moderate

Toxizität nachgewiesen werden. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre für die Verbindungen **15j** und **15f** die schlechte Löslichkeit im Medium. Ab einer Konzentration von 25 μM wurden feste Bestandteile am Boden der *wells* der Mikrotiterplatte mikroskopisch beobachtet. Aufgrund der Ausbildung kristalliner Strukturen ist eine vermehrte Ruptur der Zellmembranen durch die scharfen und spitzen Kanten der Kristalle denkbar. Dagegen war die Zielverbindung **22** zwar schwer löslich, aber schon bereits bei 1 μM lag die Zellviabilität nur noch bei weniger als 50 % gegenüber der DMSO-Lösungsmittelkontrolle. Die Verbindungen **24b** und **9c** sind gut im Medium löslich und damit können die cytotoxischen Effekte nicht auf die Löslichkeit zurückzuführen sein. Für die aktiven Verbindungen **15d**, **24a** und **24b** konnte keine direkte LDH-Inhibition nachgewiesen werden (siehe Anhang Tabelle 19).

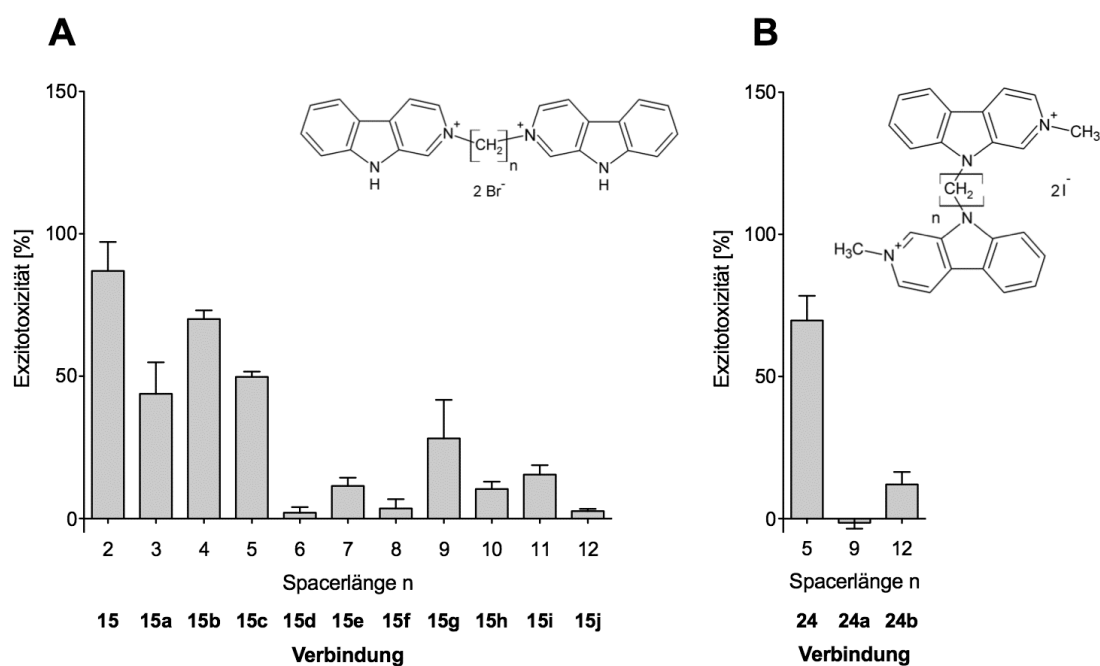


Abbildung 37 | Inhibitorische Aktivität am NMDAR in Abhängigkeit von der Spacerlänge aktiver β -Carbolin-Derivate

Verbindungen wurden bei einer Konzentration von $c = 25 \mu\text{M}$ an L12-Zellen getestet (**A**) N-2-Homobivalente β -Carbolin-Derivate; (**B**) N-9-Homobivalente β -Carbolin-Derivate.

Kompetitionsversuch mit Spermin

Aufgrund der Tatsache, dass die inhibitorische Wirkung der bivalenten β -Carbolin-Derivate scheinbar von der permanent positiven Ladung abhängt, könnte man vermuten, dass diese Verbindungen mit der Polyamin-Bindungsstelle interagieren. Unter unseren Assay-Bedingungen (10 μ M L-Glutamat/Glycin in MEM, pH 8,1) bei einer Endkonzentration von bis zu 100 μ M Spermin konnten wir keinen Effekt auf Glutamat-induzierte Exzitotoxizität an L12-Zellen beobachten (Abbildung 31). Des Weiteren haben wir in Konkurrenzexperimenten den Einfluss von Spermin (Vorinkubation) auf die inhibitorische Aktivität der Verbindungen **15d** und **24a** an L12-Zellen untersucht. Die Vorinkubation mit Spermin in unterschiedlichen Konzentrationen (getestet bis 100 μ M) war nicht ausreichend, um die inhibitorische Aktivität am NMDAR durch Verbindungen **15d** und **24a** bei einer Konzentration von 25 μ M aufzuheben (Abbildung 38).

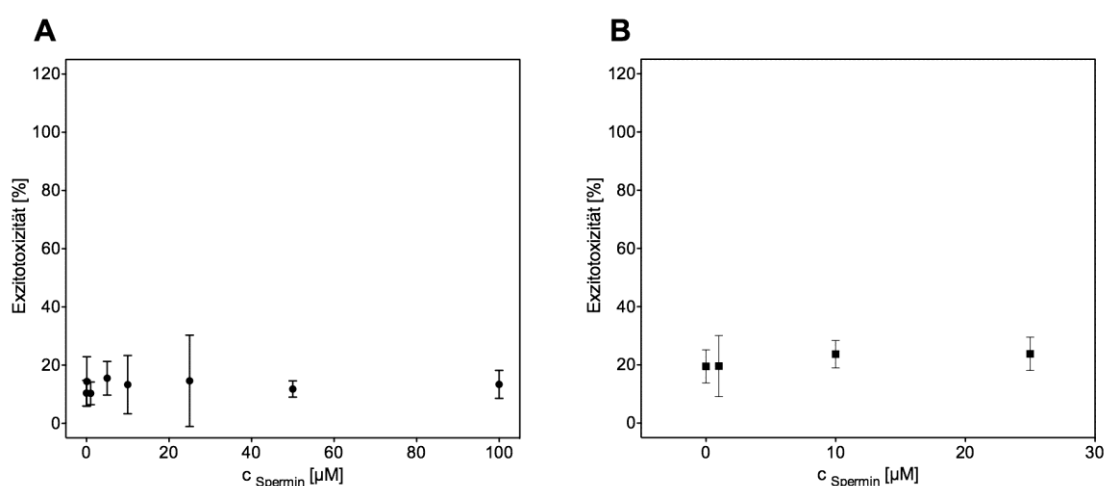


Abbildung 38 | Wettbewerbsversuche mit Spermin

(A) **15d** (c = 25 μ M) vs Spermin; (B) **24a** (c = 25 μ M) vs Spermin.

Ergebnisse des [3 H]Ifenprodil- und [3 H]-(+)-MK-801-Radioliganden-Bindungsassays

Der NMDA-Rezeptor weist neben den Polyamin-Bindestellen eine weitere Vielzahl von unterschiedlichen Bindungsarealen für Liganden auf. Dazu zählen unter anderem die Ifenprodil- und die PCP-Bindungsstelle. Letztere ist innerhalb des Ionenkanals lokalisiert und interagiert mit dem bekannten NMDA-Antagonist MK-801. Mit Hilfe von radioaktiv-markierten [3 H]-(+)-MK-801 und dessen Verdrängung lassen sich mögliche Rückschlüsse auf die Bindungsareale der Testsubstanzen am Rezeptor ziehen. Die Rezeptor-Bindungsstudien wurden am Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Universität Münster

von der Arbeitsgruppe von Prof. Bernhard Wunsch durchgeführt. In unseren Versuchen konnte keine deutlich signifikante Interaktion (Inhibition < 31 %, bei einer Endkonzentration 1 μM) der Verbindungen **15d** und **22** mit der PCP-Bindestelle beobachtet werden.

In weiteren Experimenten wurden die aktive Verbindung **15d** und die nicht aktive Verbindung **22** auf ihre Affinität an der Ifenprodil-Bindestelle untersucht. Aufgrund von Bindungsstudien mit Spermin und Ifenprodil vermutet man auf der NR2B-Untereinheit des NMDA-Rezeptors eine diskrete Bindungsstelle für Ifenprodil und eine Interaktionsstelle für Polyamine. Diese Bindungsareale liegen nahe beieinander. Des Weiteren wird eine gegenseitige Beeinflussung diskutiert (Han *et al.* 2008).

Im Rezeptor-Bindungs-Assay konnte die permanent geladene Verbindung **15d** bei Konzentrationen von über 10 μM ($K_i = 20 \mu\text{M}$, Abbildung 39) den Radioliganden [^3H]Ifenprodil signifikant verdrängen. Hingegen zeigte die ungeladene, nicht aktive Verbindung **22** eine höhere Affinität ($K_i = 106 \text{ nM}$) zur Ifenprodil-Bindungsstelle.

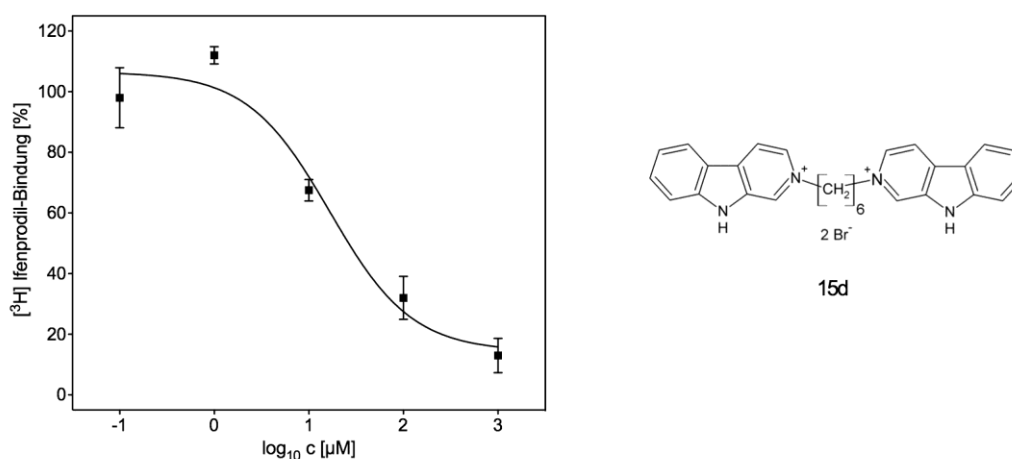


Abbildung 39 | NR2B-spezifische Radioligandenverdrängung von [^3H]Ifenprodil mit verschiedenen Konzentrationen von **15d**

Bei den Verbindungen **27d**, **27g** und **27h** traten Löslichkeitsprobleme im Medium auf, weshalb übersättigte Stammlösungen eingesetzt werden mussten. Verbindung **27g** ($CC_{50} = 30,8 \mu\text{M}$) zeigte außerdem moderate cytotoxische Effekte an L12-Zellen nach 24-stündiger Inkubation. Die übrigen Flurbiprofen-Derivate zeigten im Konzentrationsbereich bis $50 \mu\text{M}$ keine nennenswerten cytotoxischen Effekte nach 24-stündiger Inkubation (Zellviabilität $> 91 \%$, Daten nicht gezeigt) im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ($0,1 \%$ DMSO).

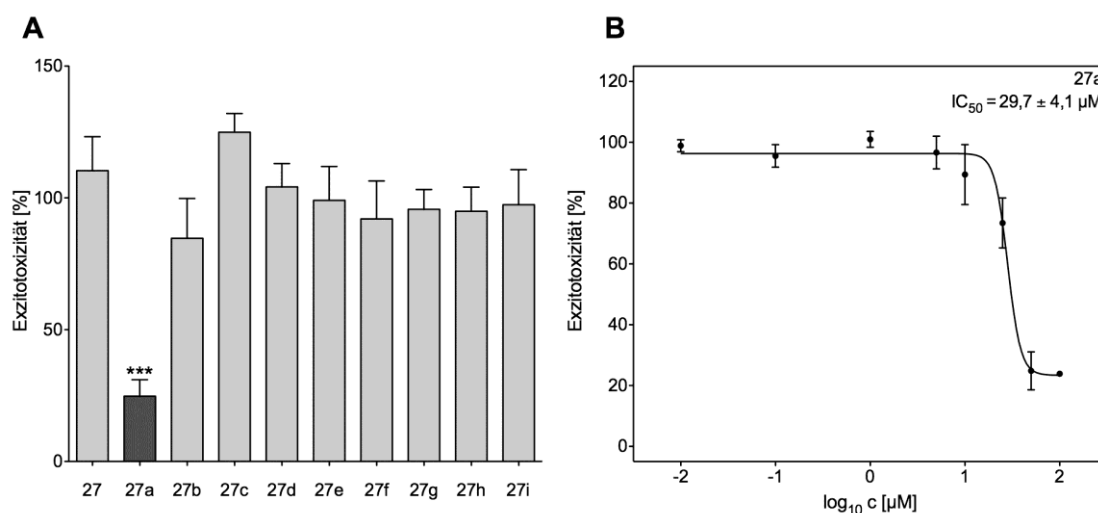


Abbildung 41 | Hemmung der NMDAR-vermittelten Exzitotoxizität durch Flurbiprofen-Derivate

(A) Vergleich der inhibitorischen Aktivität am NMDAR von Flurbiprofen-Derivaten bei $c = 50 \mu\text{M}$ (Student's t -Test vs 100%-Exzitotoxizitäts-Kontrolle; $n = 3$; $\bar{x} \pm \text{SD}$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$); (B) IC₅₀-Bestimmung an L12-Zellen von **27a**.

Phencyclidin-Derivate

Im Zuge des NMDAR-Screenings wurden auch Phencyclidin-Derivate (Abbildung 42) untersucht, um Hinweise auf Struktur-Wirkungsbeziehung in Hinblick auf die Bedeutung der Aminogruppe zu bekommen. Dabei bewirkten die Verbindungen **5** und **5a** im Gegensatz zu **5b** und **5c** eine dosisabhängige signifikante Reduktion ($p < 0,001$) der Exzitotoxizität (Abbildung 43).

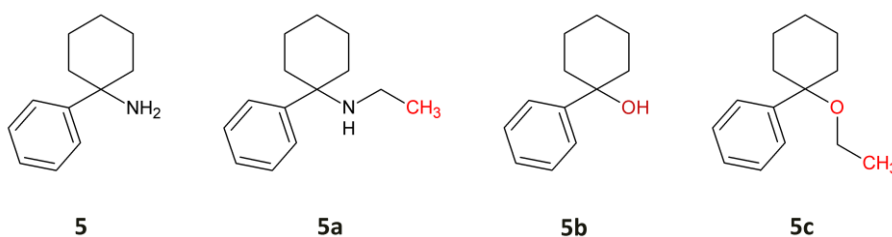


Abbildung 42 | Strukturformeln getesteter Phencyclidin-Derivate

Die Substitution der Aminogruppe durch eine Hydroxygruppe führte zu einem vollständigen Aktivitätsverlust am NMDAR. Hingegen führt die Anlagerung einer Ethylgruppe an die vorhandene Aminogruppe zu einer Steigerung der antagonistischen Aktivität am Rezeptor. Die ermittelten IC_{50} -Werte für die Verbindungen **5** (L12: $IC_{50} = 3,7 \mu M$) und **5a** (L12: $IC_{50} = 0,3 \mu M$) liegen leicht unter den Werten von Memantin (L12: $IC_{50} = 5,6 \mu M$). Die ermittelten halbmaximalen Hemmkonzentrationen der Verbindungen **5** und **5a** waren im Vergleich zur Literatur (Tabelle 12) etwa 5-fach stärker wirksam. In Übereinstimmung zu den Literaturwerten war Derivat **5a** die aktivste Verbindung und hatte eine vergleichbare Aktivität am NMDA-Rezeptor wie Phencyclidin ($IC_{50 (NR1/NR2A)} = 0,8 \mu M$, Dravid *et al.* 2007). Es gab weder Hinweise auf cytotoxische Effekte (Zellviabilität > 95 % bei 50 μM , Daten nicht gezeigt) noch konnte eine selektive Wirkung in Abhängigkeit von der Rezeptor-Zusammensetzung (NR1/NR2A und NR1/NR2B) nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Auch eine direkte LDH-Inhibition der aktivsten Substanzen (**5a**) konnte ausgeschlossen werden (siehe Anhang Tabelle 19).

Tabelle 12 | Inhibitorische Aktivität am NMDAR getesteter Phencyclidin-Derivate im Vergleich zur Literatur

NMDAR-Antagonist	NMDAR-Inhibition IC_{50} [μM]	
	NMDA-Assay ¹ NR1/NR2A	Dravid <i>et al.</i> 2007 ² NR1/NR2A
Memantin	5,6	4,4
PCP	n. b.	0,8
5 (PCA)	3,7	19,1
5a	0,3	4,92
5b	> 100	n. b.
5c	> 100	n. b.

¹Bestimmung der NMDAR-Aktivität erfolgte kolorimetrisch anhand aus den geschädigten Zellen freigesetzten cytoplasmatischen Lactatdehydrogenase, Aktivierung des NMDAR durch Zugabe von jeweils 10 μM L-Glutamat/Glycin

²Bestimmung der NMDAR-Aktivität durch Patch-Clamp-Methode (Spannungsmessung), Aktivierung des NMDAR durch Zugabe von 50 μM L-Glutamat und 30 μM Glycin

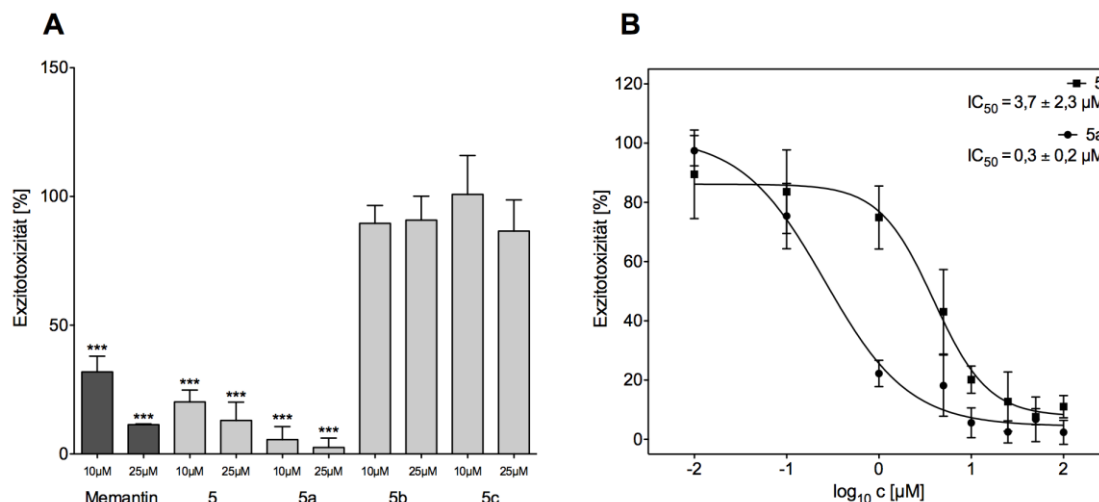


Abbildung 43 | Hemmung der NMDAR-vermittelten Exzitotoxizität durch Phencyclidin-Derivate

(A) Vergleich der inhibitorischen Aktivität am NMDAR zwischen den Phencyclidin-Derivaten bei $c = 10 \mu\text{M}$, $25 \mu\text{M}$ (Student's t -Test vs 100%-Exzitotoxizitäts-Kontrolle; $n = 3$; $\bar{x} \pm \text{SD}$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$); (B) IC_{50} -Bestimmung an L12-Zellen von Verbindung **5** und **5a**.

Selektive Hemmung der NMDAR-vermittelten Exzitotoxizität an L13-Zellen durch 3-Benzazepin-Derivate

Die Spaltung und Rekonstruktion der Bindung im Piperidin-Ring von Ifenprodil führte zu einer neuartigen Klasse von NR2B-selektiven NMDAR-Antagonisten (Abbildung 44). Diese 3-Benzazepin-Derivate wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Wünsch (Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Universität Münster) entworfen und synthetisiert. Diese zeigten mit einem Abstand von vier Methylengruppen zwischen dem basischen Stickstoffatom und dem Phenylrest eine hohe NR2B-Affinität im nanomolaren Konzentrationsbereich in Rezeptor-Bindungsstudien (Tewes *et al.* 2010).

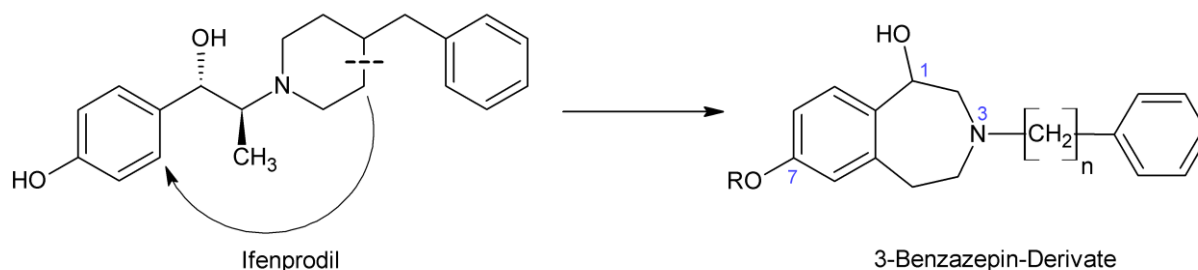


Abbildung 44 | Neuartige 3-Benzazepin-Derivate (Tewes *et al.* 2010)

Um zu klären, ob es sich bei den 3-Benzazepin-Derivaten auch um NMDA-Antagonisten handelt, wurden diese im NMDA-Assay an beiden Zelllinien getestet. Dabei zeigten die Verbindungen eine konzentrationsabhängige signifikante Reduktion ($p < 0,001$) der Glutamat-vermittelten Exzitotoxizität an L13-Zellen (mit NR2B-Untereinheit). Dagegen konnten an L12-Zellen (mit NR2A-Untereinheit) keine signifikanten inhibitorischen Aktivitäten für die Verbindungen bei einer Konzentration von 10 μM beobachtet werden (Hemmung $< 10\%$). Die Ergebnisse sind in Abbildung 46 dargestellt. Mit einem IC_{50} -Wert von 18,4 nM inhibierte **26a** die Glutamat-vermittelte Exzitotoxizität an L13-Zellen am stärksten. Die Substitution der Hydroxygruppe durch eine Methoxygruppe (Abbildung 45) führte zu einer um den Faktor 20 geringeren inhibitorischen Aktivität (Verbindung **26**: $\text{IC}_{50} = 360$ nM) am NMDAR. **26b** zeigte mit einem IC_{50} -Wert von 12,1 μM die schwächste Aktivität. In Abbildung 46 sind für die getesteten Verbindungen die einzelnen Hemmkurven abgebildet. Im Vergleich zu den in der Literatur angegebenen Werten von Ifenprodil ($\text{IC}_{50 (\text{NR1/NR2B})} = 149$ nM; Steinmetz *et al.* 2002) war die bestimmte halbmaximale Hemmkonzentration von Verbindung **26a** etwa 8-fach stärker wirksam.

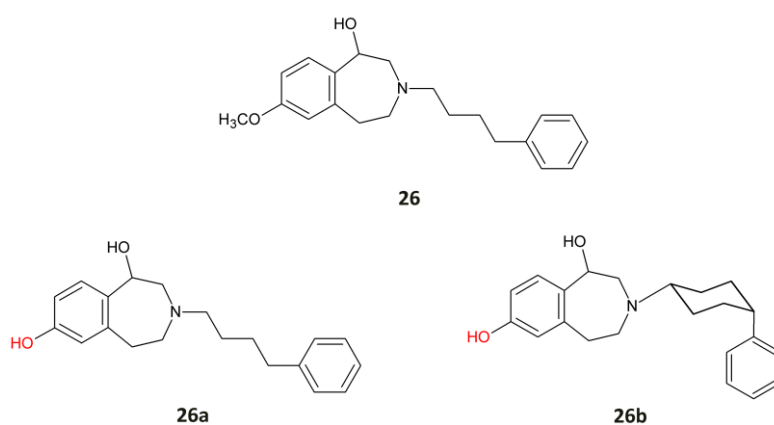
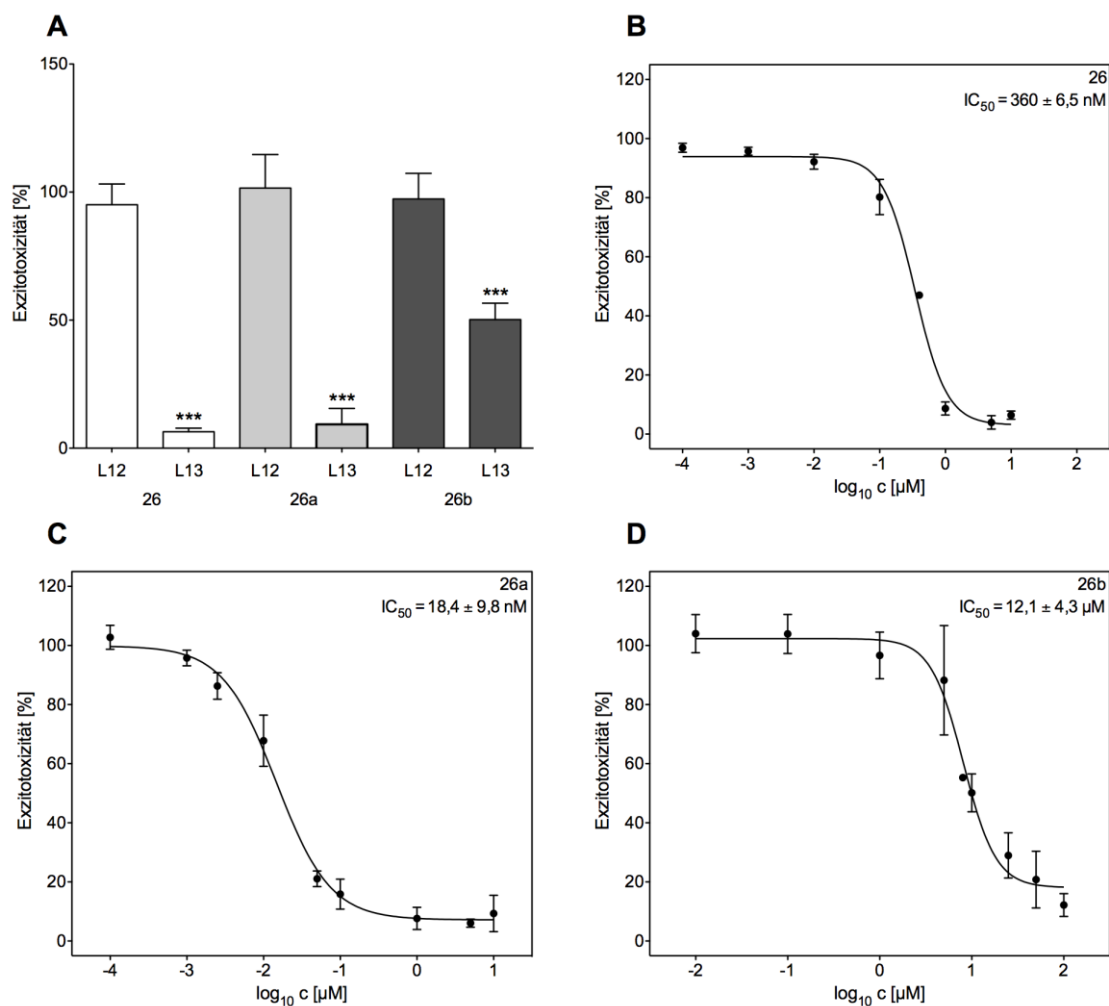


Abbildung 45 | Strukturformeln getesteter 3-Benzazepin-Derivate

Des Weiteren konnten keine unspezifischen cytotoxischen Wirkungen der Verbindungen an L12-Zellen nach 24-stündiger Inkubation und keine direkte LDH-Inhibition festgestellt werden (Anhang Tabelle 19). Die gemessenen Exzitotoxizitätswerte sind der Tabelle 13 zu entnehmen.

Tabelle 13 | Inhibitorische Aktivität am NMDA-Rezeptor und Zellviabilität der getesteten 3-Benzazepin-DerivateCC₅₀ = 50 % Zellviabilität; CC₅₀ > 100 µM entspricht > 50 % Zellviabilität bei 100 µM; n = 3-5; ± SD

Substanzbezeichnung/Chiffre	NMDAR-Inhibition Exzitotoxizität [%] ± SD bei 10 µM (IC ₅₀ ± SD)		Zellviabilität [%] ± SD bei 10 µM (CC ₅₀ [µM])
	L12-G10	L13-E6	L12-G10
26	95,1 ± 8,1 (n. b.)	6,4 ± 1,4 (360 nM ± 6,5)	103,4 ± 3,7 (> 100)
26a	101,6 ± 13,1 (n. b.)	9,3 ± 6,2 (18,4 nM ± 9,8)	101,7 ± 1,4 (> 100)
26b	97,3 ± 10,0 (n. b.)	50,2 ± 6,4 (12,1 µM ± 4,3)	100,2 ± 1,9 (> 100)

**Abbildung 46 | Hemmung der NMDAR-vermittelten Exzitotoxizität durch 3-Benzazepin-Derivate**

(A) Vergleich der inhibitorischen Aktivität am NMDAR zwischen den Zelllinien L12 und L13 durch **26**, **26a**, **26b** bei c = 10 µM (Student's *t*-Test L12 vs L13; n = 3-5; $\bar{x} \pm \text{SD}$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$); (B) Hemmung der NMDAR-vermittelten Exzitotoxizität an L13-Zellen durch Verbindung **26**; (C) durch **26a**; (D) durch **26b**.

Andere Reinsubstanzen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Vielzahl weiterer Reinsubstanzen verschiedener Strukturklassen hinsichtlich antagonistischer Aktivität am NMDA-Rezeptor untersucht, unter anderem die bei der Therapie der Alzheimer-Demenz eingesetzten Cholinesterasehemmer Rivastigmin, Galantamin sowie Tacrin und dessen Derivate (Verbindungen **28a-28e**) und das in Bärlappgewächsen vorkommende Huperzin A. Des Weiteren wurden Nifedipin und Verapamil aus der Gruppe der Calciumantagonisten, verschiedene HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statine), Pyrazol-Derivate, Azecin-Derivate sowie die Naturstoffe Rutin, Loliolid und *trans*-N-Feruloyltyramin getestet.

Mit Ausnahme von Tacrin und dessen Derivat **28c** sowie Verbindung **36** (Abbildung 47) konnte bei keiner der untersuchten Reinsubstanzen eine signifikante Reduktion (Hemmung < 15 %) der Glutamat-vermittelten Exzitotoxizität an L12-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 48). Unter Tacrin-Behandlung (50 μM) konnte die Exzitotoxizität um 79 % reduziert werden. Nur das Tacrin-Derivat **28c** wirkte geringfügig stärker (Hemmung = 81,2 %). Verbindung **36**, ein Derivat des nichtsteroidalen Antiinflammatorikums Lonazolac, zeigte im Vergleich zu Tacrin eine wesentlich schwächere inhibitorische Aktivität (Hemmung = 46 %) am Rezeptor. Die gemessenen Exzitotoxizitätswerte sind der Tabelle 14 zu entnehmen.

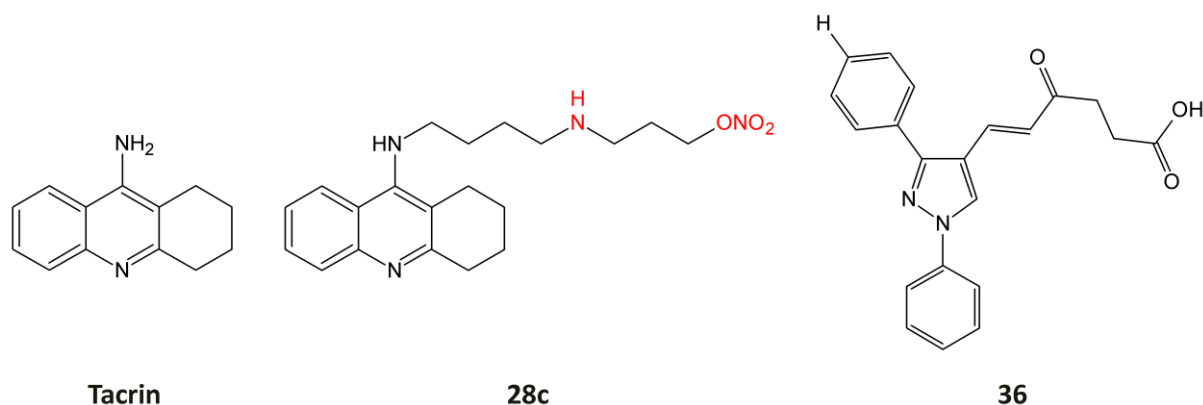


Abbildung 47 | Strukturformeln aktiver Verbindungen (Tacrin, Verbindung 28c und 36)

Für Tacrin konnte eine um den Faktor 10 stärkere inhibitorische Aktivität an L12-Zellen ($\text{IC}_{50} = 4,9 \pm 1,3 \mu\text{M}$) im Vergleich zu L13-Zellen ($\text{IC}_{50} = 44,0 \pm 2,1 \mu\text{M}$) ermittelt werden. Des Weiteren wurden keine unspezifischen cytotoxischen Effekte an L12-Zellen nach 24 h Inkubation und keine direkte LDH-Inhibition von Tacrin nachgewiesen (Anhang Tabelle 19).

Tabelle 14 | Inhibitorische Aktivität am NMDA-Rezeptor und Zellviabilität getesteter Reinsubstanzen

CC₅₀ = 50 % Zellviabilität; CC₅₀ > 100 µM entspricht > 50 % Zellviabilität bei 100 µM; CC₅₀ > 50 µM entspricht > 50 % Zellviabilität bei 50 µM; CC₅₀ < 50 µM entspricht < 50 % Zellviabilität bei 50 µM; n = 3; ± SD

Chiffre	NMDAR-Inhibition an L12-G10 Exzitotoxizität [%] ± SD bei		Zellviabilität [%] ± SD bei 50 µM (CC ₅₀ [µM]) L12-G10
	25 µM	50 µM	
28 (Tacrin)	25,4 ± 2,4	20,3 ± 3,1	99,5 ± 1,3 (> 100)
28a	n. b.	107,2 ± 12,8	50,8 ± 11,7 (50,3 ± 7,0)
28b	n. b.	143,0 ± 18,9	81,7 ± 3,6 (> 50)
28c	n. b.	18,8 ± 11,4	77,6 ± 5,5 (> 50)
28d	n. b.	138,7 ± 20,8	101,1 ± 5,8 (> 50)
28e	n. b.	148,8 ± 40,0	85,3 ± 6,6 (> 50)
29 (Atovarstatin)	n. b.	83,2 ± 9,1	62,6 ± 9,0 (> 100)
30 (Lovastatin)	n. b.	93,4 ± 9,3	88,1 ± 4,2 (> 50)
31 (Pravastatin)	n. b.	91,5 ± 10,6	98,4 ± 6,3 (> 50)
32 (Simvastatin)	n. b.	> 200	48,0 ± 0,9 (< 50)
33	n. b.	136,7 ± 31,7	86,4 ± 14,3 (> 50)
33a	n. b.	633,0 ± 94,9	n. b. (n. b.)
33b	n. b.	153,3 ± 22,3	90,5 ± 8,8 (> 50)
33c	n. b.	100,7 ± 11,8	97,5 ± 19,3 (> 50)
34	n. b.	85,7 ± 27,2	86,6 ± 5,9 (> 50)
34a	n. b.	85,5 ± 10,4	91,9 ± 5,9 (> 50)
34b	n. b.	106,1 ± 18,8	n. b. (n. b.)
35	n. b.	110,0 ± 7,2	102,4 ± 3,0 (> 100)
36	n. b.	53,8 ± 11,3	90,7 ± 1,7 (> 100)
36a	n. b.	103,5 ± 7,7	53,4 ± 4,7 (> 50)
36b	n. b.	116,4 ± 5,4	101,1 ± 4,4 (> 50)
37 (Galantamin)	96,8 ± 7,5	94,7 ± 12,4	98,7 ± 4,8 (> 100)
38 (Huperzin A)	n. b.	93,0 ± 11,4	97,6 ± 3,4 (> 100)

Fortsetzung Tabelle 14 |

Chiffre	NMDAR-Inhibition an L12-G10 Exzitotoxizität [%] \pm SD bei		Zellviabilität [%] \pm SD bei 50 μ M (CC ₅₀ [μ M]) L12-G10
	25 μ M	50 μ M	
39 (Rivastigmin)	101,7 \pm 1,2	85,1 \pm 1,7	97,0 \pm 3,5 (> 100)
40 (Nifedipin)	92,6 \pm 4,3	n. b.	80,7 \pm 5,0 (98,6 \pm 0,1)
41 (Verapamil)	104,6 \pm 5,4	n. b.	99,0 \pm 4,0 (> 100)
46 (Rutin)	n. b.	90,1 \pm 13,3	n. b. (n. b.)
47 (Feruloyltyranmin)	89,9 \pm 1,8	n. b.	97,2 \pm 0,3 (> 50)
48 (Loliodid)	94,7 \pm 0,8	n. b.	87,0 \pm 2,1 (> 50)

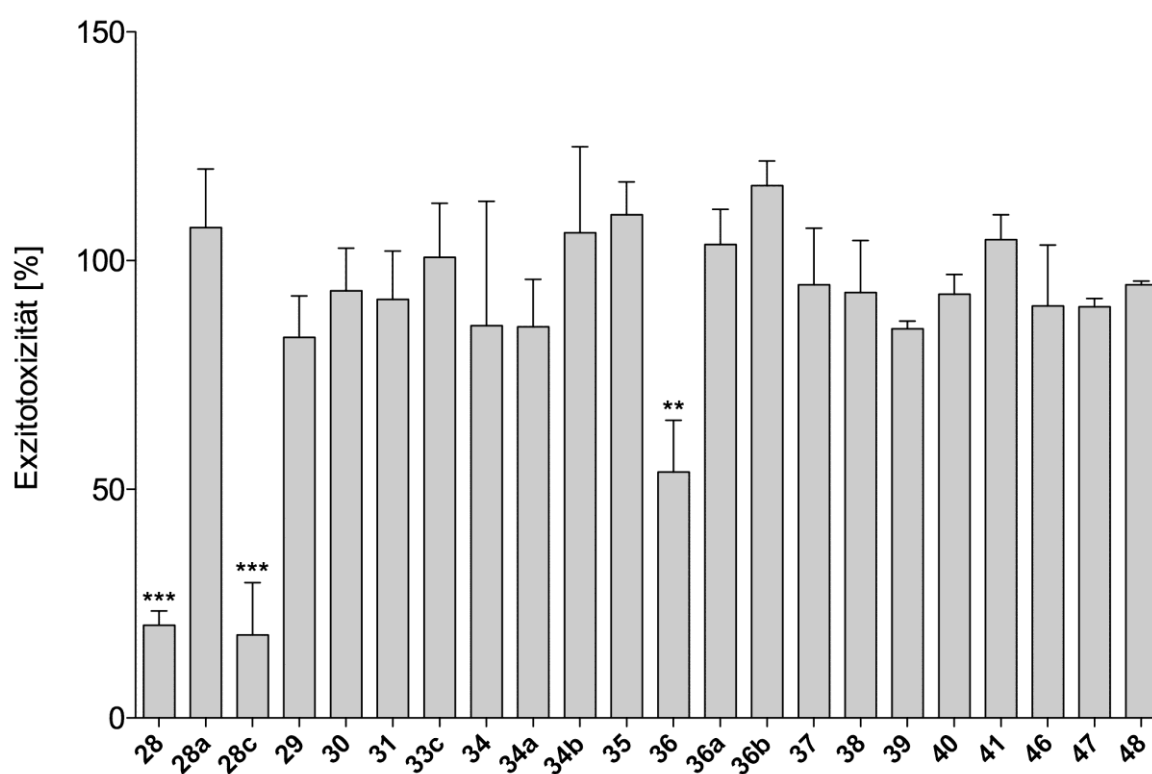


Abbildung 48 | Ergebnisse des Screenings weiterer Reinsubstanzen am NMDAR (L12-Zellen)

Alle Verbindungen wurden bei einer Konzentration von $c = 50 \mu\text{M}$ getestet, mit Ausnahme der Verbindungen **40**, **41**, **47** und **48** ($c = 25 \mu\text{M}$); stark cytotoxische Verbindungen (> 138 %) sind im Diagramm nicht dargestellt (Tabelle 14); (Student's t -Test vs 100%-Exzitotoxizitäts-Kontrolle; $n=2-3$; $\bar{x} \pm \text{SD}$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.2.2.2. TCM-Extrakte

Die Auswahl zu untersuchender Drogen der Traditionellen Chinesischen Medizin erfolgte nach indikationsbezogenen Gesichtspunkten. Diese wurden dem „Leitfaden Chinesische Phytotherapie (Hempfen und Fischer 2007) und dem „Arzneibuch der chinesischen Medizin“ (Stöger und Friedl 2009) entnommen.

Zur traditionellen Behandlung von ZNS-Störungen werden die Drogen *Gleditsiae fructus* (bei epileptiformen Anfällen und Fazialisparesen) und *Cynomorii herba* (bei Paralyse und Parästhesien) verwendet. Den Drogen *Arisaematis rhizoma*, *Gardenia fructus* und *Sappan lignum* werden antikonvulsive, sedierende und hypnotische sowie ZNS-dämpfende Wirkungen zugeschrieben. Des Weiteren wurden die Extrakte der Drogen *Coptidis rhizoma*, *Sophorae (flavescentis) radix* und *Scutellariae radix* getestet. Dieser Gruppe werden antibiotische, antimykotische und antiphlogistische Eigenschaften zugesprochen. Außerdem wird *Scutellariae radix* zusätzlich eine mild sedierende Wirkung nachgesagt.

Im NMDA-Assay wurden die verwendeten wässrigen und methanolischen Extrakte von jeder Droge mit einer Konzentration von 10 µg/ml und 50 µg/ml getestet. Das Screening erfolgte an L12-Zellen. Wie in Abbildung 49 ersichtlich, waren nur die Extrakte von *Cynomorium songaricum* am NMDA-Rezeptor aktiv. Sowohl der wässrige als auch der methanolische Auszug verringerten konzentrationsabhängig die Glutamat-induzierte Exzitotoxizität. Der wässrige Extrakt zeigte sich hierbei mit 6,4 % Exzitotoxizität im Vergleich zur 100%-Kontrolle bei einer Konzentration von 50 µg/ml etwas wirksamer als der methanolische, der die Exzitotoxizität auf 16,5 % reduzierte. Für alle anderen TCM-Extrakte konnte im getesteten Konzentrationsbereich keine signifikante inhibierende Wirkung (Hemmung < 15 %) am NMDA-Rezeptor festgestellt werden. Die gemessenen Exzitotoxizitätswerte sind der Tabelle 15 zu entnehmen.

Die verwendeten TCM-Extrakte (7-11) mit Ausnahme des methanolischen Extraktes von *Coptis chinensis* (Zellviabilität bei 50 µg/ml = 80,8 %) wiesen keine signifikanten cytotoxischen Effekte an L(tk-)-Zellen in den eingesetzten Konzentrationen (10 und 50 µg/ml) auf (Tabelle 16).

Tabelle 15 | Inhibitorische Aktivität am NMDA-Rezeptor der getesteten TCM-Extrakte

Extrakt	Auszugsmittel	Pflanze (verwendetes Pflanzenteil)	NMDAR-Inhibition an L12-G10 Exzitotoxizität [%] \pm SD bei	
			10 μ g/ml	50 μ g/ml
TCM 1 M	MeOH	<i>Arisaema erubescens</i>	119,4 \pm 8,4	108,3 \pm 4,3
TCM 1 W	Wasser	(Wurzelstock)	123,7 \pm 17,7	138,4 \pm 5,3
TCM 2 M	MeOH	<i>Curcuma wenyujin</i>	116,1 \pm 9,9	108,9 \pm 12,9
TCM 2 W	Wasser	(Wurzelknolle)	113,0 \pm 3,0	131,2 \pm 10,4
TCM 3 M	MeOH	<i>Drynaria fortunei</i>	119,3 \pm 8,2	75,7 \pm 5,4
TCM 3 W	Wasser	(Wurzelstock)	115,1 \pm 15,9	117,1 \pm 1,4
TCM 4 M	MeOH	<i>Gleditsia sinensis</i>	83,8 \pm 4,0	334,8 \pm 10,3
TCM 4 W	Wasser	(Frucht)	117,7 \pm 10,9	259,2 \pm 21,8
TCM 5 M	MeOH	<i>Caesalpinia sappan</i>	134,1 \pm 14,1	101,4 \pm 3,2
TCM 5 W	Wasser	(Rinde)	142,9 \pm 1,9	138,7 \pm 4,6
TCM 6 M	MeOH	<i>Polygonatum sibiricum</i>	85,8 \pm 12,5	115,4 \pm 12,0
TCM 6 W	Wasser	(Wurzelstock)	109,2 \pm 10,5	127,8 \pm 4,3
TCM 7 M	MeOH	<i>Cynomorium songaricum</i>	79,3 \pm 22,6	16,5 \pm 11,5
TCM 7 W	Wasser	(Kraut)	79,4 \pm 19,4	6,4 \pm 23,1
TCM 8 M	MeOH	<i>Coptis chinensis</i>	123,0 \pm 14,6	99,6 \pm 19,2
TCM 8 W	Wasser	(Wurzelstock)	101,4 \pm 14,9	93,8 \pm 17,3
TCM 9 M	MeOH	<i>Scutellaria baicalensis</i>	105,0 \pm 3,9	97,7 \pm 9,6
TCM 9 W	Wasser	(Wurzel)	110,8 \pm 10,9	93,3 \pm 8,1
TCM 10 M	MeOH	<i>Gardenia jasminoides</i>	99,3 \pm 19,3	96,7 \pm 4,0
TCM 10 W	Wasser	(Frucht)	93,7 \pm 13,5	104,9 \pm 19,5
TCM 11 M	MeOH	<i>Sophora flavescens</i>	108,1 \pm 11,8	111,5 \pm 4,1
TCM 11 W	Wasser	(Wurzel)	98,0 \pm 16,9	106,4 \pm 11,2

Für den methanolischen und wässrigen *Cynomorium*-Extrakt konnte keine direkte LDH-Inhibition beobachtet werden (siehe Anhang Tabelle 19). Damit wurde ausgeschlossen, dass Komponenten des Extraktes die enzymatische Reaktion direkt hemmen. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen (Abbildung 50) wiesen auf Proanthocyanidine als Hauptbestandteile hin. Dafür sprechen die Extrahierbarkeit mit polaren Lösungsmitteln, niedrige R_f -Werte und Anfärbbarkeit mit Vanillin-Salzsäure. Diese Proanthocyanidine könnten die wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffe sein. Dem wurde jedoch zum gegenwärtigen Zeitpunkt der Experimente noch nicht nachgegangen.

Tabelle 16 | Zellviabilität an L(tk)-Zellen ausgewählter TCM-Extrakte (Inkubation 24h)

Extrakt	Auszugsmittel	Pflanze (verwendetes Pflanzenteil)	Zellviabilität [%] \pm SD an L(tk)-Zellen	
			10 μ g/ml	50 μ g/ml
TCM 7 M	MeOH	<i>Cynomorium songaricum</i> (Kraut)	107,3 \pm 3,5	109,1 \pm 8,1
TCM 7 W	Wasser		102,9 \pm 4,5	108,9 \pm 5,1
TCM 8 M	MeOH	<i>Coptis chinensis</i> (Wurzelstock)	98,3 \pm 3,2	80,8 \pm 2,5
TCM 8 W	Wasser		96,5 \pm 1,8	95,1 \pm 5,1
TCM 9 M	MeOH	<i>Scutellaria baicalensis</i> (Wurzel)	102,6 \pm 2,2	112,9 \pm 2,1
TCM 9 W	Wasser		100,0 \pm 2,2	111,0 \pm 8,0
TCM 10 M	MeOH	<i>Gardenia jasminoides</i> (Frucht)	99,8 \pm 1,3	95,2 \pm 2,6
TCM 10 W	Wasser		97,7 \pm 2,2	98,7 \pm 0,6
TCM 11 M	MeOH	<i>Sophora flavescens</i> (Wurzel)	100,8 \pm 2,6	99,9 \pm 2,9
TCM 11 W	Wasser		100,7 \pm 2,0	100,9 \pm 1,9

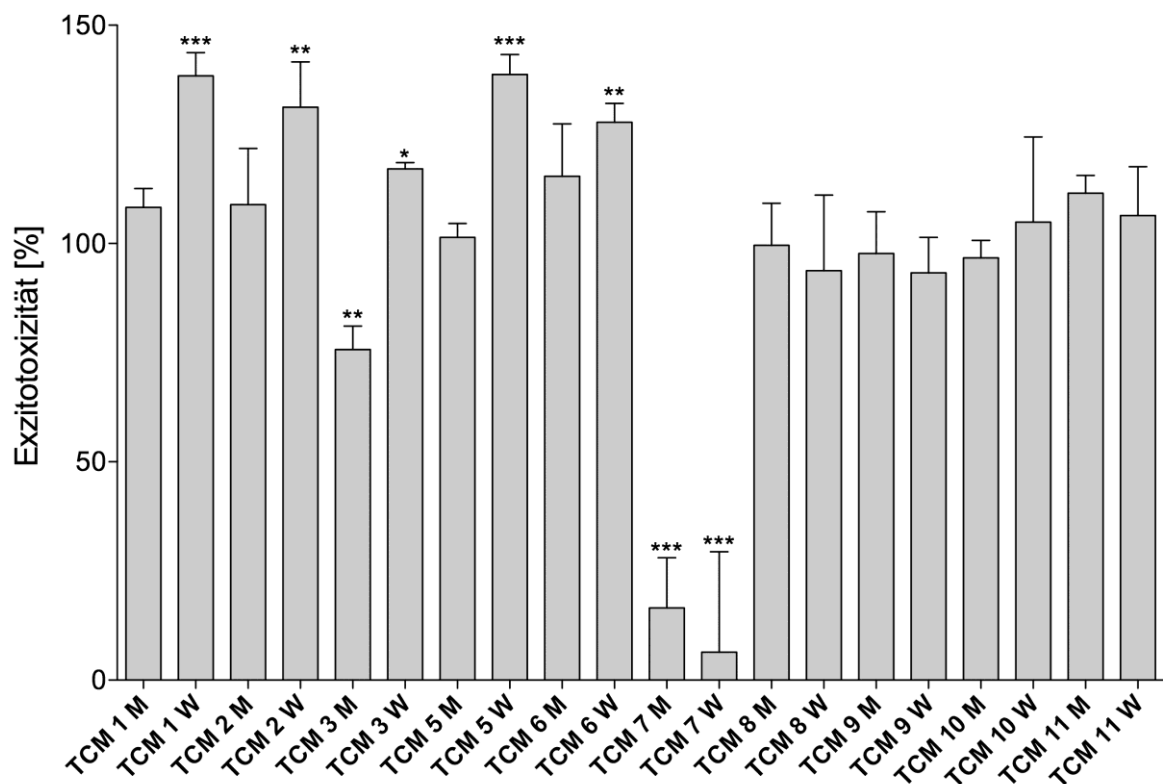


Abbildung 49 | Ergebnisse des Initialscreenings der TCM-Pflanzenextrakte am NMDAR (L12-Zellen)

Alle Extrakte wurden bei einer Konzentration von $c = 50 \mu\text{g/ml}$ getestet, stark cytotoxische Extrakte sind im Diagramm nicht dargestellt (Tabelle 16) (Student's t -Test vs 100%-Exzitotoxizitäts-Kontrolle; $n=2-3$; $\bar{x} \pm \text{SD}$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

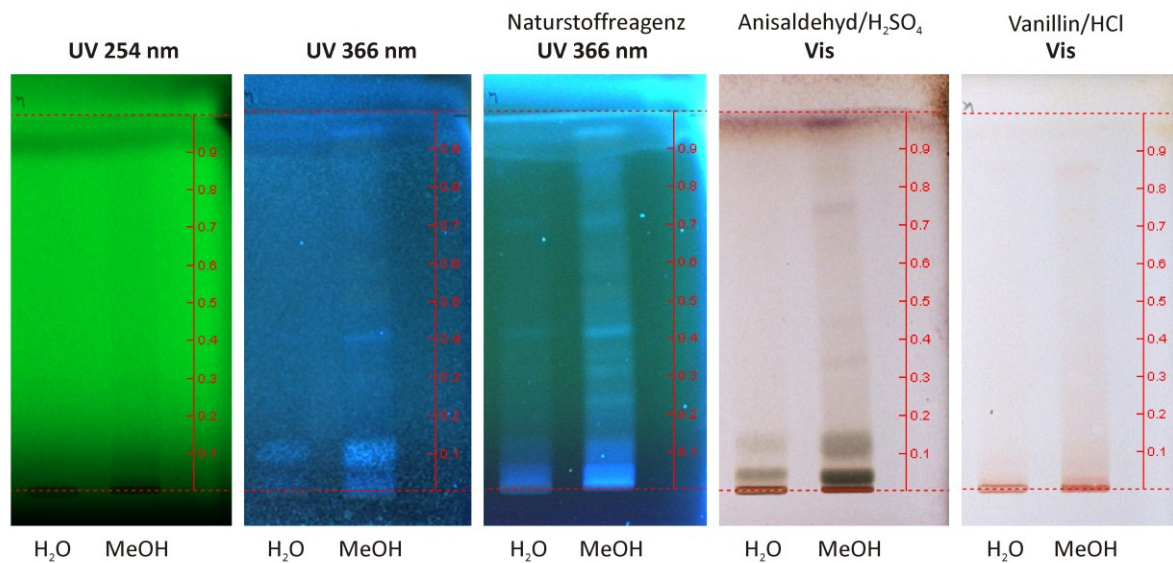


Abbildung 50 | Dünnschichtchromatogramme der Wasser- und Methanol-Extrakte von *Cynomorium songaricum* (Kieselgel 60, F₂₅₄, FM 1)

4.2.2.3. Pflanzenextrakte der Vanuatu-Wildsammlung

Im Rahmen eines Initialscreenings auf antagonistische Aktivität am NMDA-Rezeptor wurden 63 Extrakte von Drogen (18 Pflanzen) aus Vanuatu (Ambrym, Aneityum und Loh) untersucht, die aus einer Wildsammlung aus dem Jahre 2006 stammen. Insgesamt 18 Pflanzen mit potentiell immunomodulatorischen Eigenschaften wurden ausgesucht und noch vor Ort getrocknet. Die Herstellung der Extrakte erfolgte durch beschleunigte Lösungsmittlextraktion mit Dichlormethan, Ethylacetat und Methanol. Dabei entstanden verschiedene Extrakte derselben Droge, die sich in ihrer Lipophilie der Inhaltsstoffe unterschieden. Eine genaue Beschreibung der Extraktion der Pflanzenmaterials bzw. zur Auswahl der Pflanzen ist von Bradacs (2008a) beschrieben worden. Das Screening der Extrakte erfolgte an L12-Zellen (NR1/NR2A). Es wurden jeweils 10 und 50 µg/ml Extrakt zur Testung verwendet. Sechs Pflanzenextrakte der Vanuatu-Wildsammlung (0186-12 C, 1786-6C A, 2176-1 C, 2176-7L2C C, 3066-2 C und 2766-1.9 C) zeigten eine Verminderung der Glutamat-vermittelten Exzitotoxizität im NMDA-Assay (Abbildung 51). Der methanolische *Pipturus*-Extrakt reduzierte die Exzitotoxizität um 90 % bei einer Konzentration von 50 µg/ml. Nach Betrachtung der gewonnen Ergebnisse wurde die Pflanze *P. argenteus* zur weiteren Bearbeitung ausgewählt, um durch aktivitätsgeleitete Fraktionierung mögliche wirksamkeitsbestimmende Inhaltsstoffe zu isolieren.

Tabelle 17 | Inhibitorische Aktivität am NMDA-Rezeptor der getesteten Extrakte (Vanuatu)

Extrakt	Auszugsmittel	Pflanze (verwendetes Pflanzenteil)	NMDAR-Inhibition an L12-G10 Exzitotoxizität [%] \pm SD bei	
			10 μ g/ml	50 μ g/ml
0186-12 A	DCM	<i>Dracontomelon vitiense</i> (innere Rinde)	572,5 \pm 40,5	625,7 \pm 20,2
0186-12 B	EtOAc		110,7 \pm 28,4	282,2 \pm 62,3
0186-12 C	MeOH		70,1 \pm 17,9	27,7 \pm 13,1
0276-1 A	DCM	<i>Euodia latifolia</i> (Blätter)	118,6 \pm 8,0	124,4 \pm 11,8
0276-1 B	EtOAc		107,4 \pm 8,5	115,1 \pm 11,4
0276-1 C	MeOH		110,2 \pm 8,8	115,4 \pm 9,1
0476-2.1 A	DCM	<i>Gyrocarpus americanus</i> (Blätter)	103,3 \pm 10,7	101,5 \pm 2,4
0476-2.1 B	EtOAc		102,6 \pm 8,3	84,2 \pm 6,7
0476-2.1 C	MeOH		111,0 \pm 13,2	94,9 \pm 7,4
0476-1.2 A	DCM	<i>Aidia racemosa</i> (Blätter)	62,2 \pm 11,6	89,6 \pm 3,1
0476-1.2 B	EtOAc		67,7 \pm 10,6	98,2 \pm 11,7
0476-1.2 C	MeOH		56,9 \pm 0,6	96,0 \pm 8,6
0476-1.5 A	DCM	<i>Allophylus timoriensis</i>	109,4 \pm 17,8	95,5 \pm 4,8
0476-1.5 B	EtOAc		106,6 \pm 4,0	69,9 \pm 5,6
0476-1.5 C	MeOH		91,3 \pm 20,1	81,1 \pm 5,6
0476-1.6 A	DCM	<i>Dysoxylum arborescens</i> (Blätter)	101,1 \pm 5,8	145,9 \pm 18,0
0476-1.6 B	EtOAc		103,6 \pm 5,8	290,9 \pm 11,5
0476-1.6 C	MeOH		103,1 \pm 11,5	75,0 \pm 5,0
1686-1.2 A	DCM	<i>Bidens pilosa</i> (Blätter)	104,0 \pm 11,5	94,5 \pm 3,9
1686-1.2 B	EtOAc		111,8 \pm 6,1	104,0 \pm 12,1
1686-1.2 C	MeOH		96,1 \pm 7,5	117,9 \pm 12,9
1686-1.13 A	DCM	<i>Grewia inmac</i> (Blätter)	107,3 \pm 9,5	116,4 \pm 14,6
1686-1.13 B	EtOAc		112,3 \pm 9,1	120,6 \pm 8,2
1686-1.13 C	MeOH		109,2 \pm 14,7	86,2 \pm 15,8
1786-6F A	DCM	<i>Baccaurea stylaris</i> (Blätter)	119,7 \pm 16,0	93,9 \pm 10,0
1786-6F B	EtOAc		98,4 \pm 4,4	85,0 \pm 8,1
1786-6F C	MeOH		96,5 \pm 0,8	89,9 \pm 16,0
1786-6C A	DCM	<i>Baccaurea stylaris</i> (innere Rinde)	99,0 \pm 8,1	66,6 \pm 3,2
1786-6C B	EtOAc		87,4 \pm 10,1	426,9
1786-6C C	MeOH		93,1 \pm 7,0	288,3 \pm 18,8
2176-10 A	DCM	<i>Macropiper latifolium</i> (Stamm)	99,9 \pm 6,3	76,5 \pm 2,7
2176-10 B	EtOAc		108,0 \pm 1,8	86,9 \pm 6,0
2176-10 C	MeOH		118,2 \pm 5,1	95,7 \pm 7,6
2176-7L1 A	DCM	<i>Macaranga tanarius</i> (Blätter)	147,1 \pm 18,8	329,7 \pm 10,3
2176-7L1 B	EtOAc		206,7 \pm 9,6	100,7 \pm 4,2
2176-7L1 C	MeOH		116,7 \pm 10,2	64,5 \pm 9,9
2176-7L2F A	DCM	<i>Macaranga dioica</i> (Blätter)	171,7 \pm 6,4	453,2 \pm 6,8
2176-7L2F B	EtOAc		100,5 \pm 15,0	91,4 \pm 8,7
2176-7L2F C	MeOH		83,0 \pm 7,2	49,7 \pm 12,2
2176-7L2C A	DCM	<i>Macaranga dioica</i> (innere Rinde)	64,6 \pm 10,6	55,0 \pm 7,4
2176-7L2C B	EtOAc		116,6 \pm 11,5	75,8 \pm 12,7
2176-7L2C C	MeOH		86,3 \pm 1,5	52,5 \pm 7,7

Fortsetzung Tabelle 17 |

Extrakt	Auszugsmittel	Pflanze (verwendetes Pflanzenteil)	NMDAR-Inhibition an L12-G10 Exzitotoxizität [%] \pm SD bei	
			10 μ g/ml	50 μ g/ml
2176-1 A	DCM	<i>Intsia bijuga</i> (Blätter)	117,0 \pm 14,6	113,6 \pm 5,0
2176-1 B	EtOAc		111,0 \pm 9,8	105,1 \pm 12,0
2176-1 C	MeOH		77,8 \pm 23,4	9,4 \pm 4,2
2576-10 A	DCM	<i>Tabernaemontana pandacaqui</i> (Blätter)	76,3 \pm 2,0	85,1 \pm 7,0
2576-10 B	EtOAc		84,1 \pm 6,9	60,1 \pm 1,4
2576-10 C	MeOH		88,6 \pm 2,2	80,9 \pm 2,9
2576-4 A	DCM	<i>Zingiber zerumbet</i> (Rhizom)	114,7 \pm 2,6	206,4 \pm 22,0
2576-4 B	EtOAc		116,6 \pm 11,6	165,1 \pm 22,5
2576-4 C	MeOH		121,7 \pm 14,6	136,3 \pm 13,2
2766-1.1 A	DCM	<i>Acalypha grandis</i> (Blätter)	135,9 \pm 12,6	125,9 \pm 2,5
2766-1.1 B	EtOAc		129,9 \pm 4,9	127,6 \pm 6,7
2766-1.1 C	MeOH		125,3 \pm 17,5	135,4 \pm 14,8
2766-1.9 A	DCM	<i>Pipturus argenteus</i> (innere Rinde)	113,5 \pm 18,6	95,1 \pm 2,8
2766-1.9 B	EtOAc		96,1 \pm 15,6	92,1 \pm 3,5
2766-1.9 C	MeOH		83,9 \pm 10,3	9,4 \pm 5,8
2966-2 A	DCM	<i>Tabernaemontana pandacaqui</i> (Blätter)	103,3 \pm 2,6	115,7 \pm 29,5
2966-2 B	EtOAc		99,6 \pm 6,9	80,1 \pm 15,7
2966-2 C	MeOH		85,2 \pm 6,9	90,4 \pm 10,3
3066-2 A	DCM	<i>Syzygium malaccense</i> (Blätter)	80,1 \pm 1,8	331,7 \pm 37,4
3066-2 B	EtOAc		84,2 \pm 0,8	89,2 \pm 3,3
3066-2 C	MeOH		103,7 \pm 7,4	23,3 \pm 2,5

Tabelle 18 | Zellviabilität an L(tk-)-Zellen ausgewählter Extrakte

Extrakt	Zellviabilität [%] \pm SD an L(tk-)-Zellen
	50 μ g/ml
0186-12 C (<i>D.vitiense</i>)	38,0 \pm 2,9
2176-1 C (<i>I. bijuga</i>)	90,8 \pm 4,6
2766-1.9 C (<i>P. argenteus</i>)	81,2 \pm 6,5
3066-2 C (<i>S. malaccense</i>)	101,5 \pm 6,0

Für den methanolischen *Pipturus*-Extrakt konnte keine direkte LDH-Inhibition beobachtet werden (siehe Anhang Tabelle 19). Damit wurde ausgeschlossen, dass Komponenten des Extraktes die enzymatische Reaktion direkt hemmen.

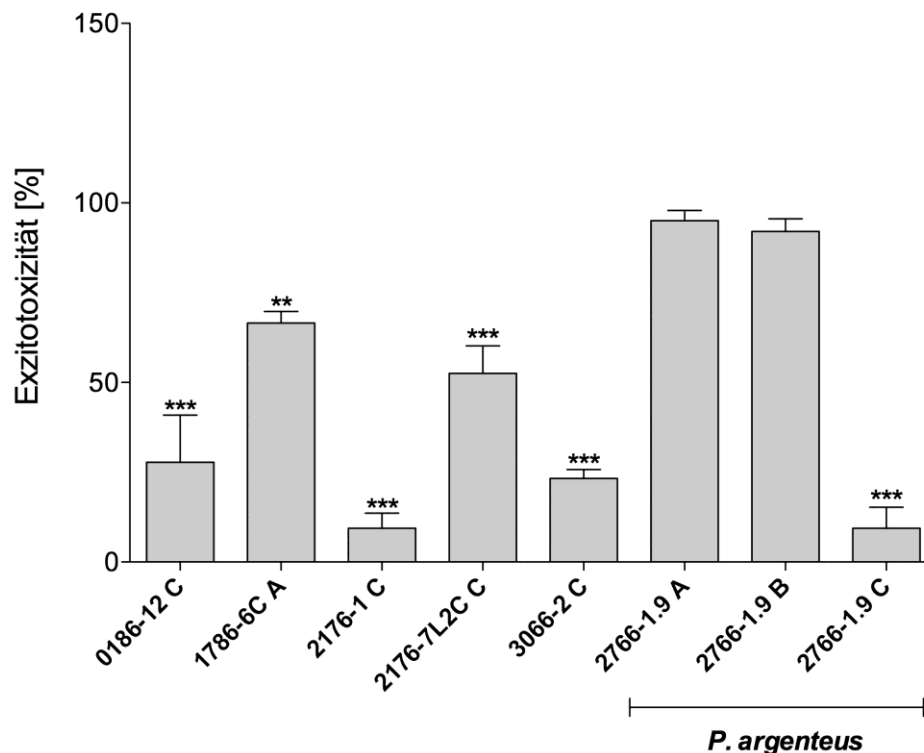


Abbildung 51 | Ergebnisse des Screenings ausgewählter Extrakte der Vanuatu-Wildsammlung

Inhibitorische Aktivität am NMDA-Rezeptor nach 4-stündiger Inkubation (Testkonzentration $c = 50 \mu\text{g/ml}$); A = Dichlormethan-Extrakt, B = Ethylacetat-Extrakt, C = Methanolextrakt; (Student's t -Test vs 100%-Exzitotoxizitäts-Kontrolle; $n=2-5$; $\bar{x} + \text{SD}$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.2.2.4. Aktivitätsgeleitete und präparative Trennung des *Pipturus-argenteus*-Extraktes

Der methanolische *Pipturus*-Extrakt (2766-1.9C) wies die höchste inhibitorische Aktivität (Hemmung = 90 %) am NMDA-Rezeptor (NR1/NR2A) und zugleich eine geringe Cytotoxizität an L(tk-) Zellen auf (Tabelle 18). Zur Identifikation wirksamkeitsbestimmender Inhaltsstoffe wurde eine aktivitätsgeleitete Fraktionierung des aktiven methanolischen Extraktes durchgeführt. Nach jedem Trennschritt erfolgte mit den erhaltenen Fraktionen ($c = 25$ oder $50 \mu\text{g/ml}$) ein Aktivitätstest im NMDA-Assay. Konnte eine Aktivität der Fraktionen (Hemmung der Exzitotoxizität $< 50 \%$) nachgewiesen werden, wurden diese zur weiteren Trennung herangezogen.

Extraktgewinnung durch beschleunigte Lösungsmittlextraktion (ASE)

Mit Hilfe der beschleunigten Lösungsmittlextraktion unter Verwendung der ASE® 100-Anlage (Dionex), ausführlich beschrieben in Kapitel 3.2.5., konnten Extrakte gewonnen werden, die sich in der Lipophilie der Inhaltsstoffe unterschieden. Aus den gewonnenen Extrakten wurden am Rotationsverdampfer unter verminderten Druck das Lösungsmittel entfernt. Dabei wurden aus insgesamt 454 g gepulverter Droge (innere Rinde) 3,3 g Dichlormethan-Extrakt (A1), 0,7 g Ethylacetat-Extrakt (A2) und 56,1 g Methanol-Extrakt (A3) gewonnen (Abbildung 52).

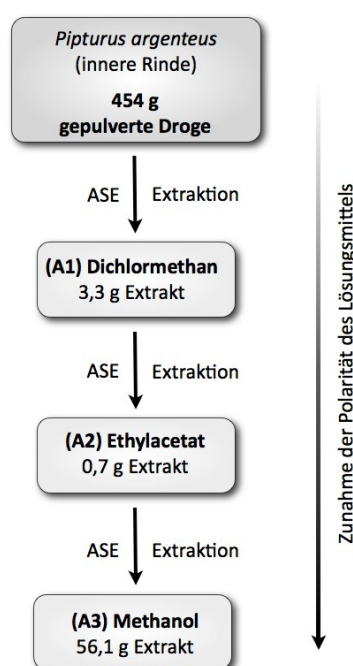


Abbildung 52 | Schema zur Herstellung der Primärextrakte mit Angabe der Ausbeute der Trockenextrakte

Die bereits im Initialscreening beobachtete Aktivität des methanolischen Extraktes konnte erneut im NMDA-Assay (Extrakt A3) bestätigt werden.

Präparative Trennung des methanolischen *Pipturus*-Extraktes A3

Der durch beschleunigte Lösungsmittlextraktion gewonnene methanolische Extrakt A3 wurde in einem ersten Schritt in Wasser aufgenommen und in einem Scheidetrichter gegen n-Butanol ausgeschüttelt (Verhältnis 1:1). Im Anschluss erfolgte eine Aktivitätsprüfung der Fraktionen B1 und B2 im NMDA-Assay. Beide Fraktionen zeigte eine ähnliche hohe Aktivität. Für die B1 Fraktion wurden 89 % und für die Fraktion B2 94 % Hemmung gemessen. In einem

weiteren Fraktionierungsschritt wurden die Fraktionen B1 und B2 jeweils getrennt über eine Sephadex™-LH-20-Säule gegeben. Diese Trennmatrix wurde aufgrund des aus DC-Untersuchungen zu vermutenden hohen Anteils an Proanthocyanidinen in Kombination mit den Lösungsmittelgemischen Ethanol/Wasser (7:3 (V/V)) und Aceton/Wasser (7:3 (V/V)) verwendet. Nach vorheriger Konditionierung der Säule mit 70 % (V/V) Ethanol wurden die Proben nacheinander mit 70 % (V/V) Ethanol und 70 % (V/V) Aceton eluiert. Die Fraktion B1 konnte in vier weitere Unterfraktionen aufgeteilt werden. Dabei zeigten die Fraktionen B1.3 und B1.4 hohe Aktivitäten. Durch dünnschichtchromatographische Untersuchungen konnten als Hauptbestandteile der Fraktionen höher oligomere bzw. polymere Proanthocyanidine nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Eine weitere Fraktionierung von B1.3 und B1.4 war nicht möglich, da für diese Proanthocyanidine kein geeignetes Trennverfahren zur Verfügung steht.

Auch die Fraktion B2, die neben den Proanthocyanidinen noch weitere Inhaltsstoffe aufwies, wurde an Sephadex™ LH-20 getrennt. 1,7 g der Fraktion B2 konnten in weitere vier Unterfraktionen getrennt werden. Um mögliche Hinweise auf wirksamkeitsbestimmende Inhaltsstoffe der einzelnen Sephadex™-LH20-Fraktionen zu erhalten, wurden diese in dünnschichtchromatographischen Untersuchungen auf DC-Platten (Kieselgel 60, F_{254} , 5 µl einer 1%igen Lösung) aufgetragen und mit Hilfe des Fließmittelsystems FM1 entwickelt. Im Anschluss erfolgte eine Behandlung mit den Sprühreagenzien Anisaldehyd-Schwefelsäure, Vanillin-Salzsäure und Naturstoffreagenz. In Fraktion C2 (Abbildung 55, Spur 1) sind verschiedene Verbindungen mit unterschiedlichen R_f -Werten sichtbar. Aufgrund der geringen inhibitorischen Aktivität (Hemmung < 15 %) wurde auf eine weitere Trennung von C2 verzichtet. Des Weiteren konnte in Fraktion C3 (Abbildung 55, Spur 2) neben einem Flavonoid (R_f -Wert = 0,35) auch Procyanidine und eine weitere Komponente mit hohem R_f -Wert identifiziert werden. Hingegen waren in Fraktion C4 (Abbildung 55, Spur 3) nur noch Procyanidine nachweisbar. Da die beiden Fraktionen C3 und C4 im NMDA-Assay inhibitorische Aktivität zeigten, wurden die erhaltenen Unterfraktionen an Sephadex™ LH-20 rechromatographiert. Zur weiteren Aufklärung von Inhaltsstoffen wurde die gewonnene Fraktion C3.1 über einen Methanol-Wasser-Gradienten durch Umkehrphasen-HPLC (RP-18) weiter fraktioniert. Die noch in der Fraktion C3 nachgewiesene Aktivität (70 % Hemmung bei 50 µg/ml) konnte in den erhaltenen HPLC-Unterfraktionen C3.1, C3.2 und C3.3 (Hemmung < 25 %) nicht mehr gefunden werden. Die rechromatographierte Fraktion C4 und ihre HPLC-

Unterfraktionen C4.1, C4.2, C4.3 und C4.4 zeigten signifikante inhibitorische Aktivitäten am NMDA-Rezeptor (Abbildung 54). Bei den Fraktionen C4.1, C4.2, C4.3, die mit 70 % (V/V) Ethanol eluiert wurden, handelt es sich offensichtlich um ein Gemisch aus oligomeren Procyanidinen. Hingegen konnten Verbindungen, die in Fraktion C4.4 zusammengefasst wurden, nur mit 70 % (V/V) Aceton eluiert werden. Dabei handelt es sich sehr wahrscheinlich um ein Gemisch aus polymeren oder höher oligomeren Procyanidinen. Das vollständige Trennschema des methanolischen *Pipturus*-Extraktes (A3) ist in Abbildung 53 dargestellt.

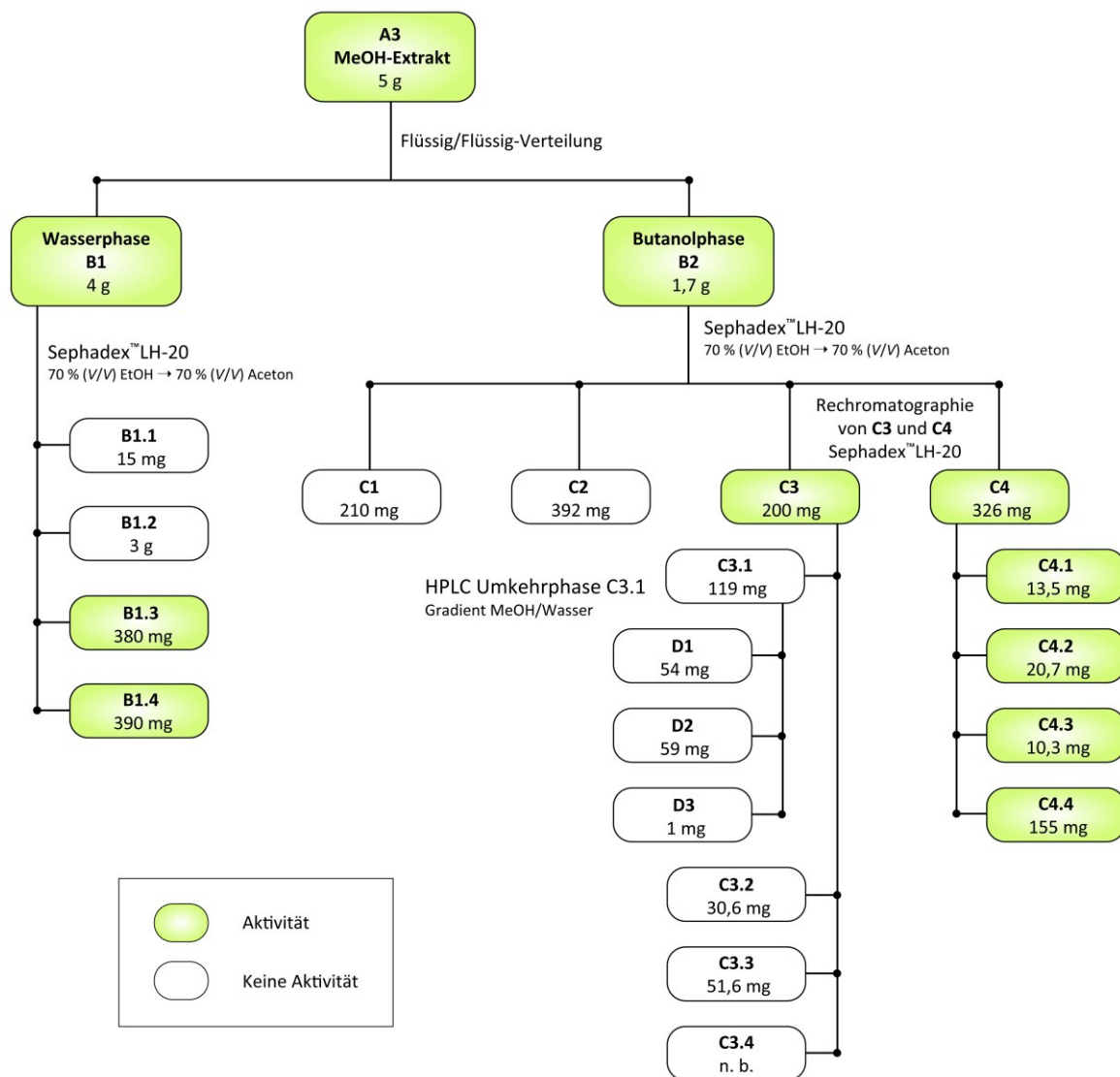


Abbildung 53 | Isolierungsschema der aktivitätsgeleiteten Fraktionierung des methanolischen *Pipturus*-Extraktes A3

Die Aufarbeitung des Extraktes erfolgte zunächst durch Flüssig/Flüssig-Verteilung mit n-Butanol/Wasser, an die sich eine Sephadex™ LH-20 Säulenchromatographie und HPLC-Verfahren zur Isolierung bzw. Reinigung von wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffen anschließen. Fraktionen, die im NMDA-Assay aktiv waren, sind grün unterlegt.

Für Fraktion C4 konnte keine direkte LDH-Inhibition nachgewiesen werden (siehe Anhang Tabelle 19). Somit wurde ausgeschlossen, dass Komponenten der Fraktion C4 die enzymatische Reaktion direkt hemmen.

Für die als Vergleich getesteten Verbindungen (+)-Catechin, (-)-Epicatechin sowie die Procyanidine B-1 und B-3 konnte nur schwache bis keine inhibitorische Effekte (Hemmung < 32 %) bei einer Konzentration von 50 µM am NMDA-Rezeptor gemessen werden (Abbildung 54).

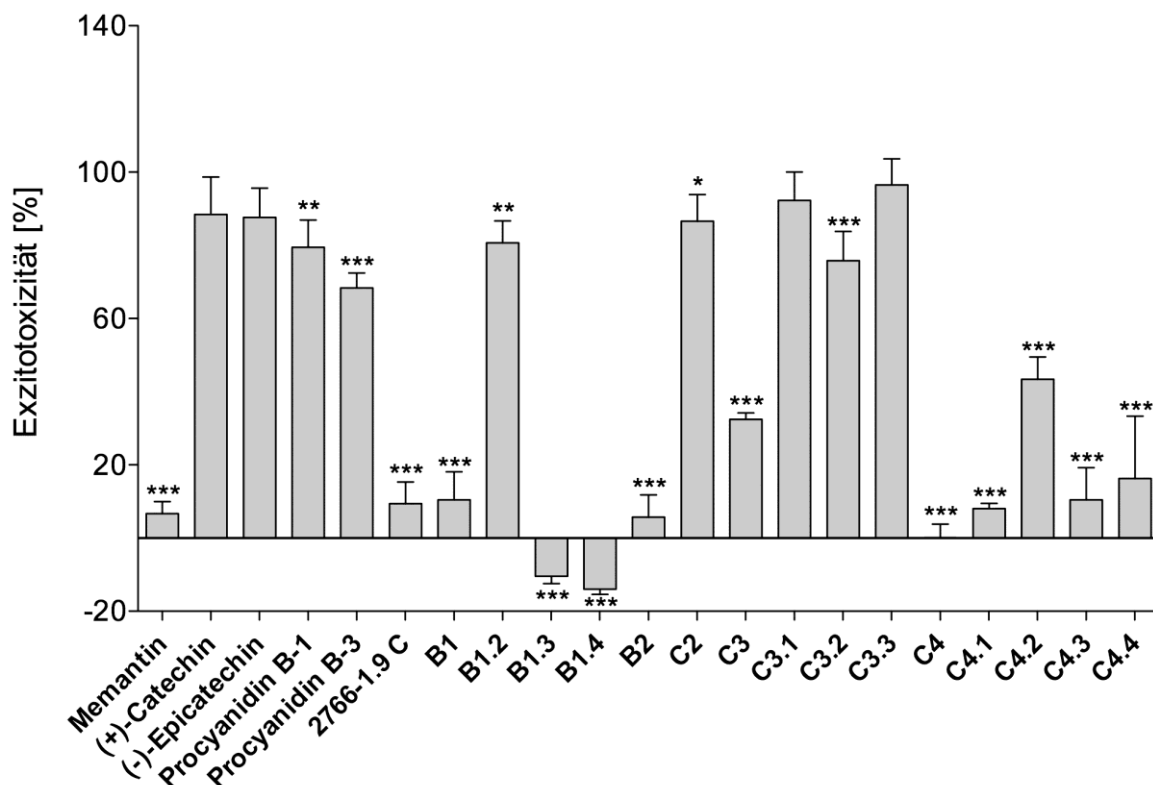


Abbildung 54 | Inhibitorische Aktivität am NMDA-Rezeptor (L12-Zellen)

Inhibitorische Aktivität am NMDA-Rezeptor nach 4-stündiger Inkubation, Extrakt 2766-1.9 C ($c = 50 \mu\text{g/ml}$); (+)-Catechin, (-)-Epicatechin, Procyanidin B-1, Procyanidin B-3 ($c = 50 \mu\text{M}$); Sephadex™-LH20-Fractionen ($c = 50 \mu\text{g/ml}$) außer C4.2, C4.3 und C4.4 ($c = 25 \mu\text{g/ml}$); (Student's t -Test vs 100%-Exzitotoxizitäts-Kontrolle; $n=2-5$; $\bar{x} + \text{SD}$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

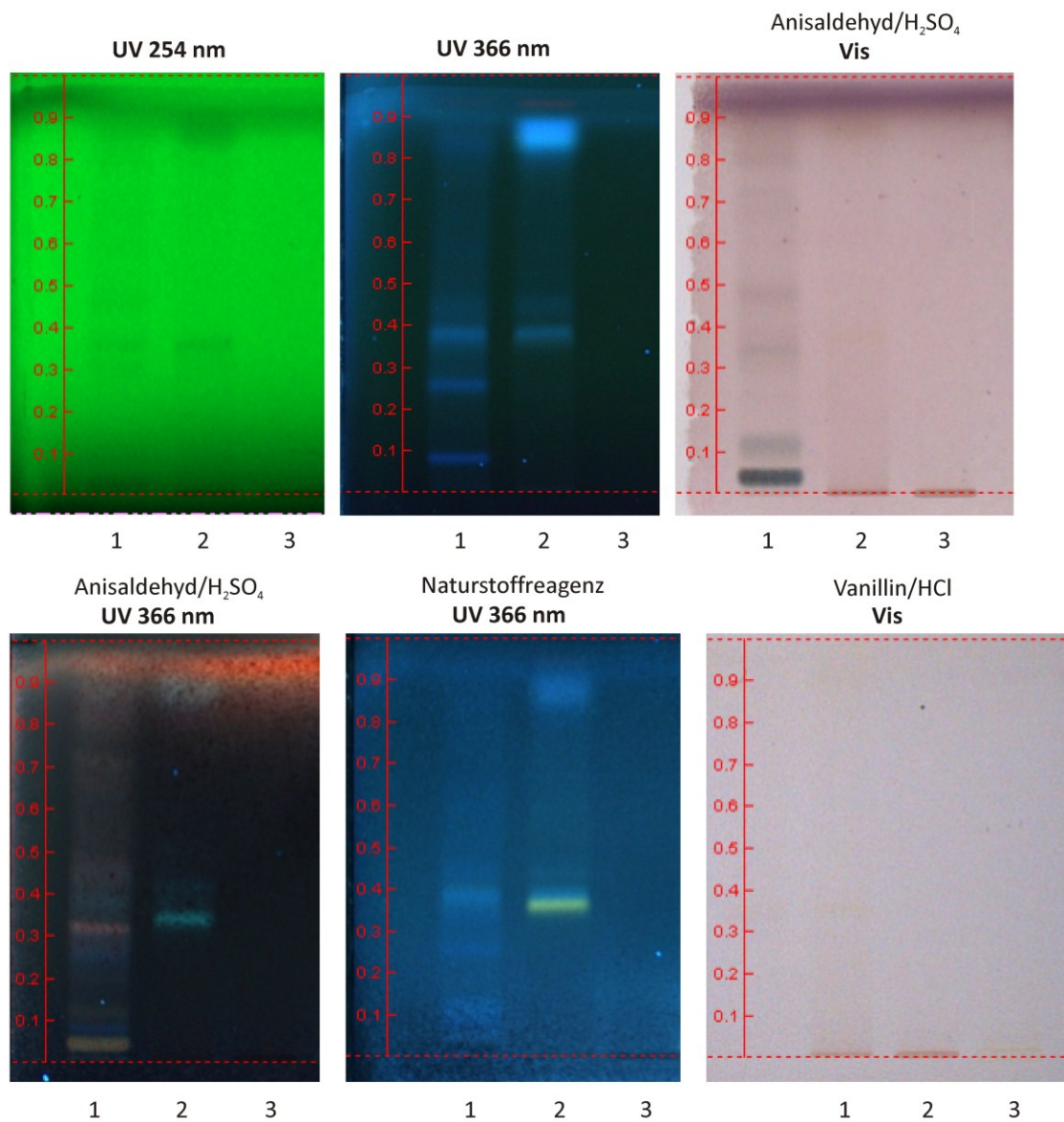


Abbildung 55 | Dünnschichtchromatogramme der Fraktionen C2 (Spur 1), C3 (Spur 2) und C4 (Spur 3) (Kieselgel 60, F₂₅₄, FM1)

4.3. ITS-Sequenzanalyse von *Pipturus argenteus*

Eine eindeutige Bestimmung der Identität von Pflanzen, gerade bei Wildsammlungen, ist wichtig und notwendig, um Verwechslungen bei nachfolgenden Lieferungen auszuschließen. Neben einer reinen morphologischen Bestimmung ist eine molekulargenetische Identitätsprüfung wünschenswert. Für eine phylogenetische Sequenzanalyse sind die ITS-Bereiche der rRNA-Gene geeignet. Die Variabilität dieser Bereiche ist dabei hoch genug, um phylogenetische Unterschiede selbst innerhalb der selben Gattung aufzuzeigen (Baldwin *et al.* 1995).

Innerhalb der Gattung *Pipturus* gibt es nur wenige fachliche Informationen. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit eine phylogenetische Sequenzanalyse der ITS-Bereiche der rRNA-Gene angestrebt. Die Isolierung der genomischen DNA (siehe Kapitel 3.2.2.) aus getrockneter Rinde erwies sich aufgrund der Anwesenheit insbesondere der phenolischen Sekundärstoffe als problematisch. Trotz dieser Schwierigkeiten ist gelungen genomische DNA in geringer Menge zu gewinnen, um damit die Amplifikation der ITS-Regionen (ITS1 und ITS2) mit Hilfe der Primer Ker010-F und Ker012-R durchzuführen. Zur Klärung der phylogenetischen und taxonomischen Beziehungen wurden die Sequenzen mit der Datenbank *Genbank*® von NCBI abgeglichen. Für die Art *P. argenteus* lag erwartungsgemäß kein Eintrag bei *Genbank*® vor. Der Datenbank-Abgleich (siehe Abbildung 56) ergab eine 97%ige Übereinstimmung der Sequenz zu *Pipturus albidus* (*GenBank*®-Eintrag AY864899.1). Arten mit geringerer Sequenzhomologie (bis zu 85 % Identität) konnten der gleichen Familie (*Urticaceae*) zugeordnet werden. Aufgrund dieser Ergebnisse können nachfolgende Lieferungen von *Pipturus argenteus* zukünftig eindeutig molekulargenetisch identifiziert werden. Die ermittelte Sequenz der ITS-Region von *P. argenteus* wurde bei *GenBank*® unter der Nummer HQ110082 hinterlegt.

P.arg	1	TCGAAACCTGCCAAGCAGAACCAACCCGCGAACATGTTTAAACAATCTCTCGGCGTGTGTTGG	60
P.alb	28T.....C	87
P.arg	61	GGCCCTTCGGGGCCTAAACTCGCCTTGTGTTGGGGGCCCCGACATCAAACAAACCCGA	120
P.alb	88	147
P.arg	121	CGCGGAACGCGCCAAGGAAATAGATAAAAGATCGGACGCAATCCTCGTGGCATCTTTGC	180
P.alb	148C.....	207
P.arg	181	TCGGGGCGTTGCGCTCGTTCGCTAATATCAAATTTGTAACGACTCTCGGCAACGGATATC	240
P.alb	208C..A.....C.....	267
P.arg	241	TCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTGGTGTGAATTGCAGAAT	300
P.alb	268	327
P.arg	301	CATGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCGTCAGGTTGAGGGCAC	360
P.alb	328T.....	387
P.arg	361	GTCTGCCTGGGCGTCACGCACCGTCGCCCCCTGCCCAGCCGTCATCGGGAGGATATA	420
P.alb	388A.....G...	447
P.arg	421	AGGGGGCGGACAGTGGCCTCCCGTGCCTCGTCGTGCGGTTGGCCGAAATCAGAGTCCTC	480
P.alb	448A.A.....C.....C.....	507
P.arg	481	GGCTTTGTTTCGCGCGACATTTCGGTGGTTTCGAACAATCGGTGCCCCGTGCGCGCTCAA	540
P.alb	508	567
P.arg	541	TGCCTTAGCGGCTGACCTTTATCGACCCCAAAGCGCATCGATGGTTCCATCGAGGCGTCC	600
P.alb	568G.....	627
P.arg	601	TCGAC	605
P.alb	628	632

ITS1 - 5,8S - ITS2 Farbmarkierungen der Sequenz
(. = Sequenzhomologie)

Abbildung 56 | Sequenzvergleich der ITS-Regionen mit BLAST (16.09.2009)

ITS-Sequenzdatenvergleich zwischen *Pipturus argenteus* (P.arg) und *Pipturus albidus* (P.alb, GenBank®-Eintrag AY864899.1). Ergebnisse der BLAST-Treffer mit AY864899.1: Max ident = 97 %; E-value = 0,0; Query coverage = 100 %).

5. Diskussion

5.1. Etablierung eines ApoE-Peptid-Assays zur Identifizierung neuroprotektiver Verbindungen

Der demographische Wandel zu einer alternden Gesellschaft wird in den kommenden Jahrzehnten zu einem Anstieg altersbedingter Erkrankungen wie der Alzheimer-Demenz führen. Diese Entwicklung stellt hohe soziale und ökonomische Anforderungen an das Gesundheitssystem. Deshalb ist es notwendig neue Wirkstoffe zur Behandlung der Alzheimer-Demenz zu finden.

Ein möglicher Ansatzpunkt für die zukünftige Behandlung der Alzheimer-Demenz ist das Apolipoprotein E. Mutationen des *APOE*-Gens werden mit vielen biochemischen Störungen in Verbindung gebracht (Mahley *et al.* 2006). Außerdem ist neben dem Alter das *APOE*ε4-Allel der einzig gesicherte genetische Risikofaktor für die sporadische Form der Alzheimer-Demenz (Marques und Crutcher 2003). In Zellkulturexperimenten konnte bereits für das Apolipoprotein E4 und ApoE-Fragmente eine Neurotoxizität nachgewiesen werden (Jordán *et al.* 1998, Marques und Crutcher 2003, Chang *et al.* 2005). Wie bereits in der Einleitung beschrieben, degradiert ApoE4 von allen drei Isoformen am schnellsten. Verantwortlich hierfür ist eine neuronenspezifische, Chymotrypsin-ähnliche Serinprotease (Harris *et al.* 2003). In verschiedenen *In-Vitro*-Experimenten wurde außerdem gezeigt, dass synthetisch erzeugte ApoE-Peptide das Neuritenwachstum hemmen und damit eine Degeneration verursachen, was schließlich zur Apoptose der neuronalen Zellen führt (Crutcher *et al.* 1994, Marques *et al.* 1996, Tolar *et al.* 1997). Hashimoto *et al.* (2000) konnten zeigen, dass nativ gewonnenes ApoE4 bei einer Konzentration von 30 µg/ml die Zellviabilität von Neuronen im Vergleich zu nativem ApoE3 signifikant reduziert. Sie vermuteten, dass die ApoE4-abhängige Neurotoxizität zu einer zelltypspezifischen Apoptose führt.

In Anlehnung an die oben beschriebene Apolipoprotein E4-abhängige Neurotoxizität sollte im Rahmen dieser Arbeit ein Testsystem aufgebaut werden, um einerseits die neurotoxische Wirkung von ApoE4 und ApoE-Fragmenten nachzuweisen und andererseits neuroprotektiv wirkende Extrakte, Naturstoffe und chemisch-synthetische Verbindungen zu identifizieren zu können. Zum Aufbau des ApoE-Bioassays wurde versucht, durch heterologe Expression Apolipoprotein E3 und E4 zu gewinnen. Die Expression der rekombinanten Fusionsproteine erfolgte sowohl in *S. cerevisiae* als auch in *E. coli*. Bakterielle Expressionssysteme neigen

jedoch häufig dazu, überexprimierte Proteine in Einschlusskörpern abzulagern. Um möglichen Löslichkeitsproblemen des Zielproteins vorzubeugen, wurde es als GST-Fusionsprotein exprimiert, da der GST-Fusionsteil die Löslichkeit günstig beeinflussen kann (Frangioni und Neel 1993). In beiden Systemen konnte die Expression von GST-ApoE-Fusionsprotein im Western-Blot nachgewiesen werden. Wegen der geringen Ausbeute an GST-ApoE-Fusionsprotein im löslichen Zellextrakt wurde von einer weiteren Expression in *S. cerevisiae* abgesehen. Hingegen war die Menge an gebildetem Fusionsprotein im bakteriellen Expressionssystem zwar deutlich höher, ein Großteil des GST-ApoE-Fusionsproteins lag aber in unlöslicher Form vor. Mögliche Ursache der Aggregation von Apolipoprotein E durch Überexpression könnte in der Funktion als Lipidtransporter und der damit verbundenen besonderen Eigenschaft des Proteins (amphipatische α -Helices) begründet sein (Rall *et al.* 1983, Mahley 1988). Auch die Verwendung des GST-Fusionsanteils konnte die Löslichkeit des Gesamtproteins offenbar nicht günstig beeinflussen. Die aus den löslichen Zellextrakten gewonnenen Mengen gereinigten GST-ApoEs waren zu gering, um ein Testsystem damit aufbauen zu können. Um mehr lösliches Fusionsprotein zu erhalten, wurden verschiedene Kultivierungsbedingungen verändert. So kann eine Senkung der Expressionstemperatur die Aggregation rekombinanter Proteine reduzieren (Schein 1991, Strandberg und Enfors 1991). Auch eine Reduzierung der Induktorkonzentration bzw. der Induktionsdauer kann sich positiv auf die Löslichkeit des Zielproteins auswirken (Weickert *et al.* 1996). Trotz vielfältiger Variationen der Kultivierungsbedingungen und des Zellaufschlusses konnten jedoch keine optimalen Bedingungen gefunden werden, bei denen sich die Löslichkeit des ApoE-Fusionsproteins erhöht. Eine Isolierung und Reinigung des Fusionsproteins konnte somit nicht in einem Maßstab erreicht werden, der für ein ApoE-basierendes Testsystem ausgereicht hätte.

Da große Mengen der gebildeten Fusionsproteine unlöslich vorlagen, wurde eine Affinitätschromatographie von His-gekoppelten ApoE-Proteinen unter denaturierenden Bedingungen in Betracht gezogen. Das aggregierte Apolipoprotein E konnte in Guanidiniumchlorid-haltigem Puffer gelöst und über eine Ni-Chelat-Säule gereinigt werden. Die anschließende Renaturierung des Fusionsproteins durch Dialyse führte jedoch zur erneuten Präzipitation der Proteine. Da bei der Entfernung des Denaturierungsmittels und der Rückfaltung des Proteins außerordentlich komplexe Vorgänge mit vielen Einflussfaktoren stattfinden, wurde von weiteren experimentellen Versuchen abgesehen. Alternativ wurde

versucht, unlösliches Fusionsprotein durch Detergenzien zu solubilisieren. Zwar konnten dadurch die Fusionsproteine solubilisiert, eine vollständige Entfernung der Detergenzien aber nicht gewährleistet werden. Reste von Detergenzien haben die Zellen geschädigt und die Messergebnisse damit stark beeinflusst. Diese Bedingungen sind daher nicht mit einem Zellkultur-Assay vereinbar und wurden deshalb verworfen.

Wie bereits dargelegt, gibt es vielversprechende Ansätze zu ApoE-Peptid-basierenden Assays (Tolar *et al.* 1997, Moulder *et al.* 1999, Harris *et al.* 2003, Mahley *et al.* 2006). Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurde ein Bioassay mit einem synthetisch hergestellten ApoE-Tandem-Peptid etabliert. Dieses ApoE-Peptid zeigte eine signifikante toxische Wirkung an SH-SY5Y-Neuroblastomzellen. Der konzentrationsabhängige toxische Effekt ist in Abbildung 25 dargestellt und belegt nach 24-stündiger Inkubation eine Reduktion der Zellviabilität um 50 % bei einer Konzentration von 54 μM . Das ApoE-Tandem-Peptid beinhaltet die LDL-Rezeptor-Binderegion (AS 141-155) als duplizierte Sequenz. Peptide, die nicht die doppelte Sequenz aufweisen, sind biologisch inaktiv und zeigen auch keine neurotoxische Aktivität (Crutcher *et al.* 1994). In den *In-Vitro*-Studien von Moulder *et al.* (1999) war bereits bei einer Konzentration von 10 μM ApoE(141-155)²-Peptid eine 50%ige Reduktion der Zellviabilität an sympathischen Neuronen zu beobachten. Es scheint, dass die SH-SY5Y-Neuroblastomzellen gegenüber dem Peptid etwas weniger sensibel sind. Im hier beschriebenen Assay wurden 50 μM ApoE-Peptid verwendet, um ausgeprägte neurotoxische Effekte an den Zellen zu sehen. Um Extrakte und Substanzen zu finden, die diese ApoE-Peptid induzierte Toxizität unterdrückten, wurden SH-SY5Y-Zellen mit Peptid und Extrakten oder Substanzen für 24 h co-inkubiert. Aus der ermittelten Reduzierung der Zellviabilität konnten dann Rückschlüsse auf die protektive Eigenschaften gezogen werden. In einer ersten Testreihe konnten für methanolische Extrakte aus *Cynomorium songaricum* und *Pipturus argenteus* sowie die Sephadex-Fraktion C4 des *Pipturus*-Extraktes protektive Effekte gegenüber der ApoE-Peptid-induzierten Toxizität beobachten werden. Die ApoE-Toxizität konnte jedoch nicht vollständig kompensiert werden. Möglicherweise sind die verwendeten Konzentrationen der Extrakte bzw. der Sephadex-Fraktion C4 von 50 $\mu\text{g/ml}$ noch zu gering.

Der Prozess der ApoE-Peptid-induzierten Toxizität scheint sehr schnell zu verlaufen, binnen 24-stündiger Inkubation wurden die neuronalen Zellen stark geschädigt. Dieser Vorgang des Zelltodes durch das bioaktive ApoE(141-155)²-Peptid, so vermuten Moulder *et al.* (1999), trägt die Charakteristika einer klassischen Apoptose oder Nekrose einhergehend mit

typischen nukleären Veränderungen wie Kernkondensation und DNA-Fragmentation. Dabei scheint die ApoE-Peptid-Toxizität nicht über die LDL-Rezeptor-Familie vermittelt zu werden. Darüber hinaus zeigen einige klassische Apoptose-Inhibitoren wie BAF (Caspase-Inhibitor) keine Effekte gegen die Peptid-Wirkung. Hingegen konnte mit Hilfe von 50 mM Kaliumchlorid die ApoE-induzierte-Toxizität verhindert werden. Dieser apoptotische Prozess scheint sehr dem ApoE4-induzierten Zelltod ähnlich zu sein (Moulder *et al.* 1999). Deshalb könnte dieses Modell des ApoE-Peptid-induzierten Zelltodes als Grundlage für einen Bioassay zur Alzheimer-Demenz dienen, um potentiell protektive Substanzen und Extrakte zu identifizieren und zu testen.

Im Zusammenhang mit der Alzheimer-Demenz wird eine mitochondriale Protektion als Konzept für die Behandlung diskutiert. Neben der primären Funktion als Energielieferant bilden die Mitochondrien eine wichtige Schaltstelle in der Zelle, die bei starker Zellschädigung die Apoptose einleitet. Im Alter bzw. bei neurodegenerativen Erkrankungen sinkt die Effizienz der Atmungskette der Mitochondrien. Damit entstehen vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Werden diese nicht durch antioxidative Enzyme unschädlich gemacht, führen sie zu einer erhöhten Protein-Oxidation, DNA-Schäden und Lipid-Peroxidation (Müller *et al.* 2009). ApoE4-Fragmente, die im Gehirn von AD-Patienten bereits nachgewiesen wurden, können mit Mitochondrien interagieren und schädigen deren Funktionen nachhaltig (Chang *et al.* 2005). Möglicherweise wird dadurch der oxidative Stress der Zellen verstärkt und mehr freie ROS freigesetzt. Insbesondere das Gehirn ist sehr anfällig für oxidativen Stress, da es mit einem geringen Gewichtsanteil des Körpers einen Großteil des benötigten Sauerstoffes umsetzt und insgesamt die größte Menge an Energie in Form von ATP benötigt. Besonders Nervenzellen reagieren sehr empfindlich auf Sauerstoff- und Glucosemangel (Müller *et al.* 2009). Eine Stabilisierung der mitochondrialen Funktion, zum Beispiel durch das Abfangen von ROS, könnte also zu einem Schutz von neuronalen Zellen beitragen. In diesem Zusammenhang gibt es Hinweise auf eine Verbesserung der mitochondrialen Funktion durch den Ginkgo-Extrakt EGb761® (Schindowski *et al.* 2001). Dieser standardisierte Spezialextrakt ist als Bestandteil von Arzneimitteln zur symptomatischen Behandlung von hirntroph bedingten geistigen Leistungseinbußen wie der Alzheimer-Demenz zugelassen.

Der methanolische *Cynomorium*-Extrakt sowie die Sephadex-Fraktion C4 von *P. argenteus* scheinen einen steigernden Einfluss auf die Metabolisierungsrate bzw. auf die Zellviabilität

der SH-SY5Y-Zellen auszuüben (Abbildung 26A). Deshalb könnte man vermuten, dass diese die mitochondriale Funktion der Zellen verbessern bzw. stabilisieren, ähnlich dem Wirkmechanismus von EGb761®. Damit hätten die Zellen möglicherweise eine höhere Toleranz gegenüber einer ApoE-Peptid-induzierten Toxizität (Abbildung 26B). Erste dünnschichtchromatographische Untersuchungen des methanolischen *Cynomorium*-Extraktes wiesen auf Proanthocyanidine als Hauptbestandteile hin. Bei der *Pipturus*-Fraktion C4 konnte als Hauptbestandteil ein Gemisch aus polymeren oder höher oligomeren Procyanidinen nachgewiesen werden. Für Proanthocyanidine konnten bereits in verschiedenen Untersuchungen antioxidative und antiinflammatorische Eigenschaften nachgewiesen werden (Nanjo *et al.* 1999, Gonçalves *et al.* 2005, Sato *et al.* 2010). Hingegen waren keine protektiven Effekte nach Behandlung der ApoE-geschädigten SH-SY5Y-Zellen mit den β -Carbolin-Derivaten **15d** und **24a** zu erkennen. Diese Verbindungen scheinen kein antioxidatives Potential zu besitzen.

Der Nutzen einer Therapie mit Extrakten, die die mitochondriale Funktion stabilisieren und verbessern, hängt von der Tatsache ab, ob die wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffe an den Wirkort in therapeutisch relevanten Dosen gelangen können. Für die therapeutisch relevanten *Ginkgo*-Flavonoide wurde bereits eine Plasma- und ZNS-Bioverfügbarkeit gezeigt. Hingegen konnten für *Ginkgo*-Triterpenlaktone zwar eine hohe Plasma-Bioverfügbarkeit sowohl im Menschen als auch in Tiermodelle nachgewiesen werden. Offen bleibt aber, ob diese die Blut-Hirn-Schranke überwinden können (Ude *et al.* 2009). Darüber hinaus müsste im Unterschied zu den Acetylcholinesterase-Inhibitoren bereits eine prophylaktische Therapie mit Extrakten vor Schädigung der Zellen begonnen werden.

Die Beurteilung der Wirksamkeit ist angesichts komplexer Zusammensetzung von Pflanzen-Extrakten schwierig. Am Beispiel von *Ginkgo*-Extrakt-Präparaten wird deutlich, wie kontrovers die Wirksamkeit in der Literatur diskutiert werden kann (IQWiG 2008, DeKosky *et al.* 2008, Snitz *et al.* 2009).

5.1.1. ApoE als therapeutisches Target zur Behandlung der Alzheimer-Demenz – Ausblick

Die medizinische Behandlung der Alzheimer-Demenz basiert gegenwärtig auf der Verabreichung von Antidementiva (Cholinesterase-Inhibitoren, NMDA-Antagonist Memantin) und der Gabe von *Ginkgo-biloba*-Extrakt-haltigen Präparaten. In den letzten Jahren hat man sich schwerpunktmäßig bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe auf

Verbindungen konzentriert, die der Anreicherung von A β -Peptiden in Form von Plaques im Gehirn entgegen wirken sollen. Jedoch waren diese Entwicklungen (passive und aktive Immunisierung gegen A β -Peptide, Aggregationshemmer usw.) bis heute noch nicht erfolgreich. Es konnte keine Verbesserung des klinischen Verlaufs der Erkrankungen erzielt werden (Gura 2008, Holmes *et al.* 2008). Deshalb ist eine weiterführende Grundlagenforschung zum besseren Verständnis der Ursachen einer komplexen Krankheit wie der Alzheimer-Demenz zwingend erforderlich. Insbesondere der genetische Risikofaktor *APOE* ϵ 4 für die sporadische Form der AD und damit verbundene ApoE-abhängige Neurotoxizität stellen einen vielversprechenden Ansatz zur Prophylaxe oder Therapie dar. Im Rahmen der aktuellen AD-Forschung konnten auf zelluläre Ebene einige Isoform-spezifische Auswirkungen nachgewiesen werden. Dazu gehören Lipid-Dysfunktion, cholinerge Dysfunktion, Beeinflussung der A β -Produktion, A β -Clearance und des intrazellulären Calciumspiegels (Tolar *et al.* 1999, Cedazo-Mínguez 2007). Aus ApoE4 durch Proteolyse entstandene Fragmente scheinen auch ein ursächlicher Faktor für neuropathologische Veränderungen zu sein. Des Weiteren führt ApoE4 im Gegensatz zu ApoE3 zu einer Destabilisierung des Cytoskeletts von Neuronen (Mahley *et al.* 2006). Hashimoto *et al.* (2000) konnten in ihren Experimenten eine ApoE-abhängige neuronale Apoptose nachweisen. Ziel einer möglichen therapeutischen Intervention wäre, die protektiven Effekte von ApoE3 und ApoE2 zu nutzen, um die schädigenden ApoE4-Effekte auszugleichen. Eine „ApoE-Therapie“ kann dabei nur abgestimmt auf den Patienten erfolgen und setzt eine positive Familienanamnese und eine Genotypisierung des *APOE*-Gens voraus. Vorstellbar wäre eine medikamentöse Behandlung durch Verwendung von kleinen strukturschaltenden Molekülen, die die ApoE4-abhängige Domänen-Interaktion unterbinden. Damit könnte eine ApoE3-ähnliche Struktur hergestellt werden, die die normale Funktion des Proteins gewährleistet (Mahley *et al.* 2006). Auch ist der Einsatz von spezifischen Protease-Inhibitoren möglich, um die Bildung proteolytischer neurotoxischer Fragmente des Apo4 zu verhindern (Harris *et al.* 2003). Dabei müssten die verwendeten Inhibitoren jedoch so spezifisch wirken, dass unerwünschte Wechselwirkungen mit anderen Proteinen unterbleiben. Ein weiterer therapeutischer Angriffspunkt wäre die transkriptionale Aktivität des *APOE*-Gens. So weisen Alzheimer-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe höhere *APOE*-mRNA-Spiegel im Gehirn auf (Lahiri 2004). In Verbindung mit

einem $\epsilon 4$ -Allel könnte der erhöhte mRNA-Spiegel eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Alzheimerschen Krankheit spielen.

Obwohl *APOE $\epsilon 4$* als einer der Hauptrisikofaktoren für die sporadische Form der AD gilt, kann eine zukünftige therapeutische Bedeutung abschließend nur schwer beurteilt werden. Ungeklärt bleibt, warum einige, aber nicht alle, Träger des $\epsilon 4$ -Allels an einer Alzheimer-Demenz erkranken. Die Beantwortung dieser Frage ist Gegenstand aktueller Forschung.

5.2. N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor-vermittelte Exzitotoxizität

Bei neurodegenerativen Hirnerkrankungen wie der Alzheimer-Demenz kommt es in Folge einer Glutamat-induzierten Überstimulierung des NMDA-Rezeptors zu einer Überladung von Nervenzellen mit Calciumionen. Die stark erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration führt schließlich zur Aktivierung nachgeschalteter Prozesse, die in ihrer Gesamtheit zur Apoptose von Nervenzellen führen. Dieser Vorgang wird als Exzitotoxizität bezeichnet (Rothman und Olney 1987). Mit NMDAR-Antagonisten kann die pathologische Wirkung des Glutamatüberschusses unterbunden werden. Um die normale glutamaterge Neurotransmission zu gewährleisten bzw. nur wenig zu beeinflussen, sollten NMDA-Antagonisten nicht mit der eigentlichen Glutamat-Bindungsstelle interagieren, also nicht-kompetitiv wirken. Ein möglicher Angriffspunkt wären Bindungsstellen innerhalb der Kanalpore, wo bereits bekannte NMDA-Antagonisten wie Memantin, Ketamin und MK-801 angreifen. Des Weiteren sollten NMDA-Antagonisten eine hohe „off-rate“ am Rezeptor aufweisen, damit sie bei Überaktivierung den Kanal schnell blockieren, aber eine zu lange Blockade des Ionenkanals verhindert wird. Diese würde sonst zu einem anhaltenden Funktionsausfall des NMDA-Rezeptors führen (Cheng und Lipton 2006). MK-801 ist ein sehr gut wirksamer NMDAR-Antagonist. Er weist eine hohe Affinität zur Bindungsstelle auf, interagiert nicht mit Glutamat-Bindungsstelle und blockiert den Ionenkanal nur im geöffneten Zustand. Jedoch ist seine Verweildauer im Ionenkanal zu lang (langsame „off-rate“). Es blockiert deshalb die normale physiologische Signalweiterleitung. Aufgrund dieser Eigenschaften und der starken psychomimetischen und halluzinogenen Wirkung besitzt MK-801 keine therapeutische Bedeutung (Lipton 2006). Auch Ketamin ist ein effektiver NMDA-Antagonist, aufgrund seiner narkotischen Wirkung kann es ebenfalls nicht zur Therapie der AD, sondern „nur“ als Narkosemittel eingesetzt werden. Memantin hingegen erfüllt weitestgehend alle Bedingungen für einen klinisch tolerierbaren NMDA-Antagonisten

und ist in der EU seit 2002 zur Behandlung sogar schwerer Formen der Alzheimer-Demenz zugelassen.

5.2.1. Charakterisierung und Validierung des NMDA-Assays

Zur Bestimmung der antagonistischen Aktivität von potentiellen Liganden an Rezeptorionenkanälen sind verschiedene Messmethoden wie Patch-Clamp oder Calcium-Imaging-Technik bekannt. Aufgrund der hohen Komplexität der Techniken eignen sie sich jedoch weniger gut zum Screening von zahlreichen Substanzen und Extrakten. Deshalb sollte eine Methode gefunden werden, die es ermöglicht, eine hohe Anzahl von Substanzen und Pflanzenextrakten zu testen.

Auf Grundlage des bei Steinmetz *et al.* (2002) beschriebenen *In-Vitro*-Testsystems für NMDA-Rezeptor-Liganden konnte unter Modifizierung der Messmethode ein Mikrotiterplatten-basierender Assay zum Screening nach NMDA-Rezeptorantagonisten aufgebaut werden. Die Bestimmung der Glutamat-vermittelten Exzitotoxizität erfolgt hierbei kolorimetrisch anhand der aus den geschädigten Zellen freigesetzten cytoplasmatischen Lactatdehydrogenase (LDH). Als vorteilhaft erwies sich eine 30-minütige Vorinkubation der Zellen mit den Testsubstanzen oder -extrakten vor der Zugabe von L-Glutamat und des Co-Agonisten Glycin, die zur Aktivierung und Überstimulierung des Rezeptors führen. So ist sichergestellt, dass der potentielle Ligand sich schon am Kanal befindet, nicht erst ankommt, wenn die irreversible Reaktion auf die L-Glutamat/Glycin Zugabe abgelaufen ist. Die Inkubation erfolgte für 4 h in MEM (ohne Phenolrot und Zusätze). Aufgrund der guten Verträglichkeit (geringe Zellschädigung) und des Ausschlusses von Wechselwirkungen mit Serumbestandteilen bzw. um mögliche Restaktivität von LDH im Serum zu entgehen, wurden die Experimente in serumfreien MEM durchgeführt.

Beim genaueren Betrachten birgt der Aufbau des NMDA-Assays auch Nachteile. Die Bestimmung der antagonistischen Aktivität erfolgt nicht direkt, sondern über die Freisetzung und Aktivität der Lactatdehydrogenase. Dafür wird nach 4-stündiger Inkubation 100 µl Zellüberstand mit 100 µl Reaktionslösung versetzt. Dadurch erhöht sich die Zahl der möglichen Einflussfaktoren. Eine Fehlerquelle könnte eine direkte LDH-Inhibition durch Testsubstanzen oder -extrakte sein, die zu falsch positiven Ergebnissen führen kann. Um solch eine Beeinflussung auszuschließen, wurden aktive Testsubstanzen bzw. -extrakte in einem Kontrollexperiment (Kapitel 3.2.4.1.) auf direkte LDH-Inhibition getestet.

Zur funktionellen Charakterisierung des NMDA-Assays wurden die Aktivitäten der bekannten NMDAR-Antagonisten Ketamin, Memantin und MK-801 bestimmt und mit den Aktivitäten getesteter Substanzen und Extrakte verglichen. Des Weiteren wurde der Einfluss der modulierend-wirkenden Substanzen Spermin und Spermidin auf den NMDA-Rezeptor untersucht. Mit dem hier etablierten Bioassay lassen sich zum einen Verbindungen und Extrakte mit hoher Affinität zum NMDA-Rezeptor finden, und zum anderen kann auch auf NR2A- und NR2B-Selektivität geprüft werden. In diesem Assay als potentielle Antagonisten aufgefallene Substanzen oder Extrakte können dann in weiterführenden Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* näher charakterisiert werden. Dabei ist sicherlich die Frage zu klären, ob solche Verbindungen bzw. Extrakte an ihre Wirkorte in therapeutisch relevanten Konzentration gelangen.

5.2.2. Screening nach inhibitorischer Aktivität am NMDA-Rezeptor

5.2.2.1. β -Carbolin-Derivate

Die Substanzklasse der β -Carboline (Pyrido[3,4-*b*]indole) ist in der Natur weit verbreitet. Die Indolalkaloide kommen sowohl in Pflanzen als auch in Tieren vor. So sind die Harmanalkaloide Harmin und Harmalin als Inhaltsstoffe in *Peganum harmala* (Steppenraute) zu erwähnen. Die β -Carboline zeigen vielfältige Wirkungen, einige werden als potentielle Neurotoxine in der Literatur diskutiert, andere wiederum als potentielle Wirkstoffe betrachtet (Moura *et al.* 2006). So wirken Harmin und Harman als reversible Inhibitoren der Monoaminoxidase A (MAO-A) stimulierend auf das ZNS (Herraiz *et al.* 2010). Maher und Davis (1996) konnten bereits neuroprotektive Eigenschaften von β -Carbolinen gegenüber exzitotoxischen Effekten von Dopamin und Glutamat nachweisen. Des Weiteren erwiesen sich die Carboline als potente Cholinesterasehemmer (Rook 2009). Aufgrund der neuroprotektiven Eigenschaften und der Wirkung auf das ZNS stellen die β -Carboline eine interessante Naturstoffklasse dar. Um eventuelle Rückschlüsse auf protektive Effekte gegenüber der Glutamat-vermittelten Exzitotoxizität zu gewinnen, wurden im Rahmen dieser Arbeit neuartige β -Carbolin-Derivate auf ihre antagonistische Aktivität am NMDA-Rezeptor untersucht. Es wurden sowohl monovalente als auch bivalente β -Carbolin-Derivate getestet. Das Konzept bivalenter Verbindungen („bivalent ligand approach“) stellt eine Möglichkeit dar, Affinität bzw. Aktivität von Liganden zu erhöhen. Dabei werden zwei identische (homobivalente) oder verschiedene (heterobivalente) Wirkstoffmoleküle über

einen Abstandshalter (Spacer) kovalent miteinander verbunden. Am Beispiel von Tacrin konnte bereits gezeigt werden, dass bivalente Tacrin-Verbindungen im Vergleich zu den monovalenten Derivaten eine höhere inhibitorische Aktivität (bis zu 1000-fach) gegenüber der Acetylcholinesterase aufwiesen (Pang *et al.* 1996).

In einem ersten Screening ($c = 25 \mu\text{M}$) zeigten die monovalenten β -Carboline schwache bis keine signifikanten Aktivitäten (Hemmung $< 20 \%$) am NMDA-Rezeptor. Die an Position C-6 bromierten Verbindungen **6e** und **10** wiesen im Vergleich zu anderen monovalenten β -Carbolen eine geringe, aber statistisch signifikante Aktivität auf. Eine Bromierung an Position C-6 scheint sich günstiger auf die Aktivität auszuwirken als eine Methoxylierung bzw. keine Substitution an dieser Stelle des Moleküls. Die an Position N-9 methylierte Verbindung **10d** konnte die Exzitotoxizität um 20% senken, war aber im Vergleich zu der unmethylierten Verbindung **6e** schwächer wirksam. Diese reduzierte die Exzitotoxizität um 30% bei einer Konzentration von $25 \mu\text{M}$.

In verschiedenen pharmakologischen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Harmalin kompetitiv die Bindung des Radioliganden [^3H]MK-801 hemmt (Du *et al.* 1997, Moura *et al.* 2006, Paterson *et al.* 2009). Du *et al.* (1997) vermuteten, dass der bekannte Harmalin-induzierte Tremor durch Wechselwirkung mit der MK-801-Bindestelle hervorgerufen wird, die den Ionenkanal öffnet. Harmalin weist nach dieser Hypothese nicht antagonistische, sondern agonistische Eigenschaften auf. In dem von uns verwendeten Testsystem konnte keine signifikante antagonistische Aktivität von Harmalin (Hemmung $< 10 \%$ an L12-Zellen) beobachtet werden. Darüber hinaus konnte aber auch keine gesteigerte Exzitotoxizität nachgewiesen werden. Vermutlich ist durch die Behandlung mit L-Glutamat und Glycin der Kanal bereits so stark geöffnet und damit eine maximale Schädigung durch Calcium-Einstrom in Gang gesetzt, dass Harmalin-Effekte nicht zu detektieren waren.

In weiteren Untersuchungen wurden neuartige N-2- und N-9-bivalente β -Carboline im NMDA-Assay auf ihre antagonistische Aktivität getestet. Dabei waren homobivalente, quartäre β -Carboline, die über den Pyridinstickstoff (N-2) mit Methylengruppen als Spacer (**15-15j**) verknüpft sind, besonders aktiv. Sie zeigten statistisch signifikante inhibitorische Aktivitäten am NMDA-Rezeptor, die mit Memantin vergleichbar waren. Es wurden N-2-Verbindungen mit bis zu 12 Methylengruppen als Spacer getestet, wobei Verbindungen ab 9 Methylengruppen jedoch verminderte Löslichkeit aufwiesen, wodurch die pharmakologischen Untersuchungen erschwert wurden. Aufgrund der Ausbildung

kristalliner Strukturen wäre eine vermehrte Ruptur der Zellmembranen durch scharfe Kanten der Kristalle denkbar, was eine Beeinflussung der Messwerte zur Folge haben könnte.

Die Substitution am Spacer durch Ethoxy-Gruppen (**17**) bzw. durch einen starren p-Xylyl-Spacer (**16**) sowie die Verkleinerung des aromatischen Grundkörpers (**20**, **21**) führten zum Teil zu erheblichen Aktivitätsverlusten. Der Austausch des größeren aromatischen β -Carbolin-Ringsystems gegen einen bzw. zwei Pyridin-Ringe führt zu einem vollständigen Aktivitätsverlust. Darüber hinaus konnten Veränderungen an Position C-6 durch eine Methoxy- (**18**) oder Hydroxygruppe (**19**) die Aktivitäten am Rezeptor nicht steigern. Auch die partielle Reduktion (**22-22a**) führte zu einem vollständigen Aktivitätsverlust. Im Gegensatz zu den quartären Verbindungen **24a** (L12: $IC_{50} = 1,4 \mu M$, L13: $IC_{50} = 2,9 \mu M$) und **24b** (L12: $IC_{50} = 4,4 \mu M$, L13: $IC_{50} = 5,6 \mu M$) zeigen nicht quartäre N-9 bivalente β -Carboline (**23-23b**, **25**) nur geringe bis keine inhibitorischen Aktivitäten am NMDAR (Hemmung < 25 %).

Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass lediglich der quartäre Stickstoff und die Bivalenz-Strategie nicht ausreichend sind für hohe Aktivitäten am NMDA-Rezeptor. Für die Wechselwirkung mit dem Rezeptor scheint einerseits ein größeres aromatisches Ringsystem und andererseits eine Kettenlänge mit mehr als fünf Methylengruppen notwendig zu sein. Im Vergleich zu Literaturangaben gibt es dahin gehend gewisse Übereinstimmungen. Für homobivalente Tacrin-Derivate erwies sich eine Heptylenkette als idealer Spacer im Hinblick auf Aktivität und Selektivität an der Acetylcholinesterase (Pang *et al.* 1996). Auch bei Bis-Galantamin-Derivaten zeigten Spacer mit 8 und mehr Methylengruppen gesteigerte Aktivitäten (Holzgrabe *et al.* 2007). Schlussfolgernd kann man sagen, dass bei den getesteten homobivalenten β -Carboline im NMDA-Assay die optimale Spacerlänge zwischen 6 bis 8 Methylengruppen liegt. Möglicherweise können permanent geladene homobivalente β -Carboline ab einer bestimmten Kettenlänge besser an den NMDA-Rezeptor binden und gleichzeitig diesen für den Ionenfluss blockieren. Vorstellbar wäre, dass diese Moleküle räumlich getrennte Affinitäten zu Bindungsareale der Zielstruktur aufweisen und gleichzeitig durch ihre positive Ladung den Ionenfluss nachhaltigen beeinflussen.

Cytotoxische Effekte der Verbindungen können die Interpretation der Messergebnisse erschweren. Deshalb wurde für alle getesteten β -Carbolin-Derivate der Einfluss auf die Zellviabilität bei einer Konzentration von 50 μM untersucht. Besonders auffällig waren die Verbindungen **22** und **9c**, die nach 24-stündiger Inkubation eine starke Toxizität an L12-

Zellen aufwiesen. Wie bereits erwähnt, werden die β -Carboline in der Literatur als potentielle Neurotoxine angesehen. In Position N-2 methylierte β -Carbolin-Verbindungen inhibieren die mitochondriale Atmungskette und führen somit zu einem reduzierten Energiestoffwechsel. In Folge der verminderten ATP-Synthese werden die Zellen letztendlich stark geschädigt (Sayre *et al.* 1991, Collins *et al.* 1992). Bei der Verbindung **9c** handelt es sich um ein gut lösliches β -Carbolin-Derivat, das an Position N-2 einen Octyl-Rest besitzt. Im Vergleich zu den Derivaten **9-9c** scheint dieser Octyl-Rest die Toxizität an L12-Zellen besonders stark zu erhöhen ($CC_{50} = 1,8 \mu M$). Im Gegensatz zu Verbindung **9c** war die Zielverbindung **22** schwer löslich, aber bereits bei einer Konzentration von $1 \mu M$ lag die Zellviabilität nach 24 -stündiger Inkubation nur noch bei weniger als 50 % gegenüber der DMSO-Kontrolle. Bei dieser Verbindung handelt es sich um ein nicht permanent geladenes bivalentes Derivat mit der Spacerlänge $n=5$. Die hohe Toxizität lässt sich vermutlich nicht allein durch die geringe Löslichkeit erklären, denn erst bei einer Konzentration von $25 \mu M$ wurden feste Bestandteile am Boden der *wells* der Mikrotiterplatte beobachtet. Des Weiteren konnte bei den aktiven Derivaten **15j**, **15f** und **24b** eine moderate Toxizität ($CC_{50} > 34 \mu M$) nachgewiesen werden, die jedoch erst bei Konzentrationen über der IC_{50} -Werte im NMDA-Assay zu beobachten waren.

Für ausgewählte Verbindungen wurde außerdem die Aktivität hinsichtlich selektiver Wirkung am NMDAR bestimmt. Besonders auffällig war dabei, dass Verbindung **10** (9-Methyl- β -Carbolin) an L12-Zellen (NR2A-Untereinheit) keine signifikante Aktivität aufwies. Dagegen konnte an L13-Zellen (NR2B-Untereinheit) die Exzitotoxizität um 46 % reduziert werden. Die inhibitorische Aktivität am NMDAR von Verbindung **10** ist jedoch deutlich schlechter als die von Memantin. Zwar konnten in Zellkulturexperimenten an neuronalen Zellen bereits für Verbindung **10** neuroprotektive Effekte gezeigt werden (Hamann *et al.* 2008), ob diese Effekte aber im Zusammenhang mit dem NMDA-Rezeptor stehen, müssen nachfolgende Untersuchungen noch zeigen.

Rezeptor-Bindungsstudien

Die Funktion des NMDA-Rezeptors wird reguliert durch den extrazellulären pH-Wert (Tang *et al.* 1990, Hynd *et al.* 2004a). Darüber hinaus wirken auch endogene Polyamine wie Spermin und Spermidin modulierend auf den NMDAR (Benveniste und Mayer 1993, Williams *et al.* 1994). Beruhend auf der Tatsache, dass die Aktivität der bivalenten β -Carbolin-Derivate

offenbar von der permanenten Ladung abhängig ist, könnte man vermuten, dass die aktiven Verbindungen mit der Polyamin-Bindestelle der Untereinheiten NR1 oder NR2 in Wechselwirkung treten. Um mögliche Rückschlüsse auf Bindungsstellen am NMDA-Rezeptor zu erhalten, wurde der Einfluss der modulierend wirkenden Verbindungen Spermin und Spermidin untersucht. Unter unseren Testbedingungen (10 μ M L-Glutamat und Glycin, MEM, pH = 8,1) konnte lediglich bei 100 μ M Spermin eine leichte Erhöhung der Exzitotoxizität an L13-Zellen (NR2B-Untereinheit) beobachtet werden (Abbildung 31, Kapitel 4.2.1.). Steinmetz *et al.* (2002) haben in ihren Untersuchungen bereits einen solchen NR2B-spezifischen Effekt von Spermin auf den NMDA-Rezeptor nachgewiesen, wobei dieser eine pH-Wert Abhängigkeit gezeigt hat. Die Spermin-Effekte verstärken sich mit Abnahme des pH-Wertes und sind am größten zwischen pH 7,4 - 6,8. Sie wirken scheinbar der Protonen-Inhibition entgegen (Steinmetz *et al.* 2002). Übereinstimmend mit ihren Ergebnissen konnte dagegen keine signifikante Reduktion oder Erhöhung der Exzitotoxizität an L12-Zellen (NR2A-Untereinheit) unter Spermin- und Spermidin-Behandlung beobachtet werden (Abbildung 31, Kapitel 4.2.1.).

Die Effekte von Spermin auf den NMDA-Rezeptor werden als vielfältig und komplex beschrieben. Dazu zählen in niedrigen Konzentrationen verstärkende, in höheren Konzentrationen inhibierende Eigenschaften (Benveniste und Mayer 1993). Stimulierende Effekte von Spermin können sowohl Glycin-abhängig als auch spannungs- und Glycin-unabhängig am Rezeptor erfolgen. Die Konzentrationen von Spermin und Spermidin sind im temporalen Cortex von AD-Patienten signifikant erhöht. Deshalb vermutet man, dass durch anhaltend hohe Konzentrationen von Polyaminen der NMDA-Rezeptor zusätzlich stimuliert und damit die Schädigung durch Glutamat-Aktivierung verstärkt wird (Hynd *et al.* 2004a). Ein solcher Anstieg des extrazellulären Sperminspiegels könnte durch neurotoxische A β -Peptide hervorgerufen werden (Yatin *et al.* 2001).

Darüber hinaus kann aber auch eine spannungsabhängige Blockade des NMDA-Rezeptors durch Eindringen von Spermin in die Kanalpore erreicht werden. Die bei physiologischen pH-Werten positiv geladenen Spermin-Moleküle treten in Wechselwirkung mit den negativen Ladungen in der Nähe der Kanalöffnung und blockieren so den Ionenfluss. Dieser Vorgang läuft ähnlich wie bei der Magnesiumblockade ab (Rock und MacDonald 1992).

In unseren Kompetitionsversuchen konnten wir zeigen, dass sich die inhibitorischen Effekte der Verbindungen **15d** und **24** am NMDA-Rezeptor (NR1/NR2A) nicht durch Zugabe und

Vorinkubation von Spermin beeinflussen lassen (Abbildung 38, Kapitel 4.2.1.). Deshalb könnte man vermuten, dass der Wirkmechanismus für die Blockade des Rezeptors durch die permanent geladenen β -Carbolin-Derivate ein anderer ist als für Spermin.

Verschiedene Literaturquellen berichten zu dem, dass sich die Bindestelle für den NR2B-selektiven Antagonisten Ifenprodil in der Nähe der Polyamin-Bindestelle befindet. Es wird davon ausgegangen, dass ein Teil der aminoterminalen regulatorischen NR2B-Domäne sowohl für eine Polyamin-Stimulation, als auch für eine Ifenprodil-Inhibition verantwortlich ist (Han *et al.* 2008, Mony *et al.* 2009). In dem durchgeführten NR2B-spezifischen Bindungs-Assay mit [3 H]Ifenprodil an isolierten Membranen von Zellen der murinen Fibroblastenzelllinie L13-E6 konnte für das permanent geladene N-2-bivalente Derivat **15d** gezeigt werden, dass es den Radioliganden (Abbildung 39, Kapitel 4.2.1.) signifikant verdrängt. Hingegen zeigte die ungeladene, nicht aktive Verbindung **22** eine 94-fach höhere Affinität zur Ifenprodil-Bindestelle, aber keine inhibitorische Aktivität am NMDA-Rezeptor. Daher kann man vermuten, dass beide Verbindungen zwar mit der Ifenprodil-Bindestelle interagieren, aber diese nicht der eigentliche Wirkungsort am NMDA-Rezeptor ist. Aufgrund der Tatsache, dass **15d** an den Zelllinien L12-G10 ($IC_{50} = 2,2 \mu M$) und L13-E6 ($IC_{50} = 6,5 \mu M$) die gleiche inhibitorische Aktivität aufwies, erscheint die Wirkung über eine weitere Bindungsstelle plausibel. Deshalb ist denkbar, dass eine solche Bindungsstelle an beiden Rezeptor-Subtypen vorhanden ist. In unseren Untersuchungen konnten wir bereits zeigen, dass MK-801 an beiden Zelllinien die gleiche inhibitorische Aktivität aufwies und somit nicht selektiv am NMDA-Rezeptor wirkt. Dabei interagiert MK-801 mit der PCP-Bindungsstelle innerhalb des Ionenkanals (Wirt *et al.* 2007). Es wäre möglich, dass permanent geladene bivalente β -Carbolin-Derivate ebenfalls innerhalb des Rezeptor-Ionen-Kanals binden und somit den Ionenfluss blockieren. Für beide getestete Verbindungen (**15d** und **22**) konnte jedoch keine signifikante Affinität zur PCP-Bindungsstelle nachgewiesen werden. Zusammenfassend lässt sich damit sagen, dass die aktiven bivalenten β -Carbolin-Derivate offensichtlich einen von den bekannten NMDA-Antagonisten wie MK-801, Memantin und Ifenprodil abweichenden Wirkmechanismus bzw. Wirkungsort zur Blockierung des Calcium-Einstroms haben. Ungeachtet dessen ist es bemerkenswert, dass die ungeladene Verbindung **22** eine hohe Affinität zur Ifenprodil-Bindestelle aufwies, aber den Calcium-Ionenstrom nicht blockieren konnte. Scheinbar reicht eine hohe Affinität allein nicht aus, um den Kanal zu blockieren.

Bivalente- β -Carboline als potentielle Multi-Target-Wirkstoffe zur Behandlung der Alzheimer-Demenz

Wie in der Einleitung ausführlich dargelegt, handelt es sich bei der Alzheimer-Demenz um eine Krankheit mit multifaktorieller Pathogenese. Dies erfordert eine angemessene, breit gefächerte Behandlung mit modernen Therapeutika (Multi-Target-Strategie). Acetylcholinesterase- und Butyrylcholinesterase-Inhibitoren verbessern die cholinerge-Signalverarbeitung im ZNS und sind etablierte Therapeutika zur Behandlung der Alzheimer-Demenz. Verschiedene N-2- und N-9-bivalente β -Carboline sind potente AChE-/BChE-Inhibitoren (Rook 2009). Des Weiteren zeigen sie hohe inhibitorische Aktivitäten am NMDA-Rezeptor, die vergleichbar mit denen etablierter Arzneistoffen sind. Homobivalente β -Carboline könnten daher als neue Multi-Target-Wirkstoffe zur Behandlung der Alzheimer-Demenz eingesetzt werden (Abbildung 57).

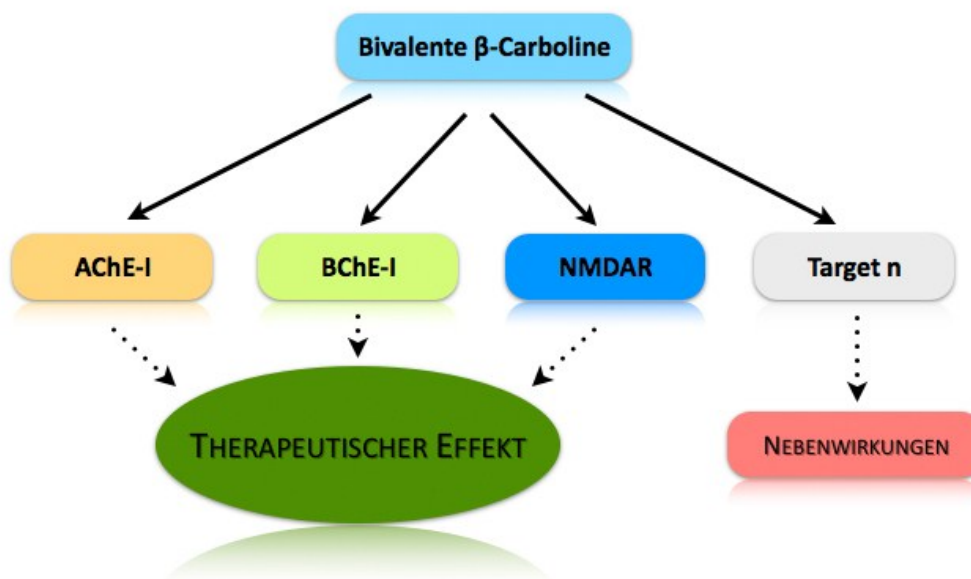


Abbildung 57 | Mögliche Multi-Target-Therapie bivalenter β -Carboline zur Behandlung der Alzheimerschen Krankheit

Um ihre Wirkung insbesondere im ZNS entfalten zu können, müssen diese Wirkstoffe die Blut-Hirn-Schranke überwinden. Ionen, niedermolekulare Stoffe sowie lipophile Verbindungen sind in der Lage diese Barriere zu passieren. Für die getesteten β -Carbolin-Derivate wurde die Bioverfügbarkeit im ZNS durch *In-Vivo*-Studien noch nicht untersucht. Aufgrund der Ladungseigenschaften und Größe der bivalenten β -Carboline ist es unklar, ob

therapeutisch relevante Konzentrationen am Wirkungsort im Gehirn erreicht werden können. Vorstellbar wäre ein Prodrug-Konzept, demzufolge lipophilere Vorstufen die Blut-Hirn-Schranke passieren, um später durch enzymatische Reaktionen im ZNS in ihre Wirkform überführt zu werden. β -Carboline können im Gehirn durch N-Methyltransferasen in Position N-2 methyliert und somit quaternisiert werden (Gearhart *et al.* 2002). Deshalb wäre es denkbar, nicht permanent geladenen, lipophilen Derivate (**23a-23b**) als Wirkstoffe einzusetzen, die dann *in vivo* durch N-Methyltransferasen in Position N-2 methyliert und somit in die aktiven Verbindungen (**24a-b**) umgewandelt werden.

Eine weitere Möglichkeit wäre die Nutzung von Transportsystemen im Gehirn. Im Endothel der Blut-Hirn-Schranke sind mehrere Carrier-vermittelte Transportsysteme bekannt, u. a. Aminosäuretransporter. Diese transportieren essentielle hydrophile Aminosäuren durch die Barriere hindurch. Wirkstoffe könnten so über die Ausnutzung dieser Transportwege an ihren Wirkungsort gelangen (Tamai und Tsuji 2000, Misra *et al.* 2003). Ein bekanntes Beispiel ist der Carrier-vermittelte Transport von L-DOPA über den LAT1-Transporter für neutrale Aminosäuren, da Dopamin die Blut-Hirn-Schranke selbst nicht passieren kann (Mutschler 2001). Neben den spezifischen Transporter-Systemen wäre auch der Transport über partikuläre Trägersysteme (Liposomen, Nanopartikel) denkbar.

Um abschließend die Frage zu klären, ob geladene und nicht geladene bivalente β -Carboline die Blut-Hirn-Schranke überwinden können, müssen in Tiermodellen Wiederfindungsstudien an den entsprechenden Organen des ZNS durchgeführt werden.

5.2.2.2. Flurbiprofen-Derivate als potentielle Alzheimer-Therapeutika

Neben den derzeit zugelassenen Therapeutika zur Behandlung der Alzheimer-Demenz gibt es Hinweise aus klinischen Untersuchungen auf alternative Behandlungsstrategien mit nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAR), da sie den Krankheitsverlauf von AD-Patienten günstig beeinflussen können. Auch mögliche präventive Effekte werden in dieser Richtung diskutiert (Lleo *et al.* 2007). In diesem Zusammenhang wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Flurbiprofen-Derivate auf ihre antagonistische Aktivität am NMDA-Rezeptor untersucht. Mit Ausnahme des Methylesters **27a** ließ sich bei keinem weiteren Flurbiprofen-Derivat eine signifikante Hemmung der Exzitotoxizität nachweisen. Die Aktivität des Flurbiprofen-Derivats **27a** ($IC_{50} = 25,4 \mu M$) ist im Vergleich zum etablierten Arzneimittel Memantin ($IC_{50} = 5,6 \mu M$) an Zellen mit einem NR1/NR2A-Rezeptorkomplex wesentlich

geringer. Zur Behandlung wären somit höhere Dosen des Flurbiprofen-Derivates nötig, um therapeutische Effekte am NMDA-Rezeptor zu erzielen, was mit Blick auf das breit gefächerte Nebenwirkungspotential der NSAR ungünstig erscheint. Ein Wirksamkeitsnachweis ist aber oft problematisch. So war R-Flurbiprofen (Tarenflurbil), das Enantiomer des Flurbiprogens, in Phase II noch vielversprechend, dagegen konnte in der Phase III keine Verbesserung des Denkvermögens und der Alltagsaktivitäten mehr nachgewiesen werden (Green *et al.* 2009).

5.2.2.3. Phencyclidin-Derivate

Phencyclidin (Phenylcyclohexylpiperidin, PCP) wirkt als *open channel blocker* antagonistisch an NMDA-Rezeptoren. Aufgrund seiner dissoziativen und halluzinogenen Wirkung besitzt PCP keine therapeutische Bedeutung, wird aber als Modellschubstanz zur Untersuchung der Funktionsweise und Bindungsmechanismen von NMDA-Rezeptoren genutzt. Im Zuge des Screenings wurden verschiedene Phencyclidin-Derivate (Abbildung 42) auf ihre antagonistische Aktivität an zwei verschiedenen NMDA-Rezeptorkomplexen (NR1/NR2A und NR1/NR2B) untersucht. Die Verbindungen **5** und **5a** zeigten im Vergleich zur Kontrolle eine statistisch signifikante Reduktion der Exzitotoxizität an beiden Rezeptorkomplexen. Die Substitution der Aminogruppe durch eine Hydroxygruppe bei den Derivaten **5b** und **5c** führte zu einem vollständigen Wirkungsverlust. Wenn der basische Stickstoff durch Sauerstoff ersetzt wird, ist die Blockierung des Ionenkanals aufgehoben, und der Ligand kann sehr wahrscheinlich nicht mehr im Inneren des Kationenkanals binden. Hingegen führt die Anlagerung einer Ethylgruppe (**5c**) an die vorhandene Aminogruppe zu einer geringfügigen Aktivitätssteigerung. Der IC_{50} -Wert lag für Verbindung **5** bei 3,7 μ M und für Verbindung **5a** bei 0,3 μ M. Die ermittelten IC_{50} -Werte sind mit den Werten von Memantin und Ketamin vergleichbar bzw. geringfügig besser. Es gab keine Hinweise auf cytotoxische Effekte, außerdem konnte keine selektive Wirkung in Abhängigkeit der Rezeptor-Zusammensetzung nachgewiesen werden.

Unterschiede in der Basizität der Verbindungen sind kaum vorhanden (Derivat **5** $pK_s = 10,05$; Derivat **5a** $pK_s = 10,20$), sodass dies kein Erklärungsansatz für die Affinitätszunahme sein kann. Entscheidender für die Zunahme ist vermutlich der sterische Faktor, d. h. das an dieser Stelle der Bindetasche von der Ethylgruppe aus ein oder mehrere Wassermoleküle verdrängt

werden können und dadurch ein Energiegewinn der Bindung erzielt werden kann. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Dravid *et al.* (2007) veröffentlichten Daten überein.

5.2.2.4. 3-Benzazepin-Derivate

Der NMDA-Rezeptor besitzt aufgrund der Heterogenität seiner Untereinheiten ein umfangreiches und komplexes Bindungsverhalten. Durch seine diskrete Verteilung im Gehirn sind selektive Eingriffsmöglichkeiten vorstellbar und könnten zur Verbesserung von Nebenwirkungsprofilen beitragen (Stark *et al.* 2000b). Ifenprodil (Vadilex®) wurde ursprünglich als α_1 -Rezeptorantagonist entwickelt. Später erkannte man, dass die Verbindung und ihre Derivate selektiv an die NR2B-Untereinheit des NMDA-Rezeptors binden (Williams 1993, Mony *et al.* 2009). Die antagonistische Affinität liegt hier im nanomolaren Konzentrationsbereich (Reynolds und Miller 1989). Nachteilige Effekte ergeben sich jedoch durch Affinitäten zu 5-HT_{1A}-, 5-HT₂- und σ -Rezeptoren sowie die Beeinflussung von spannungsabhängigen Calciumkanälen. Zusätzlich zu diesen Nebeneffekten ist die Bioverfügbarkeit von Ifenprodil sehr gering, da es im Körper schnell und umfangreich metabolisiert wird (Kew und Kemp 2005).

Ausgehend von Ifenprodil wurden neue 3-Benzazepin-Derivate von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Bernhard Wunsch (Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Universität Münster) entworfen und synthetisiert. Diese zeigten ähnliche NR2B-Affinitäten wie die Ausgangsverbindung, jedoch mit verbesserten Selektivitätsprofilen. Die drei getesteten NR2B-selektiven 3-Benzazepin-Derivate (**26**, **26a** und **26b**, Abbildung 44/45) zeigten einerseits eine hohe NR2B-Affinität im nanomolaren Konzentrationsbereich (**26**: $K_i = 5,4$ nM, **26a**: $K_i = 13,5$ nM, **26b**: $K_i = 3,3$ nM, persönliche Mitteilung Prof. Dr. Bernhard Wunsch) und andererseits keine signifikante Affinität zur PCP-Bindestelle. Im NMDA-Assay an L13-Zellen (NR1/NR2B-UE) hemmte Verbindung **26a** die Glutamat-induzierte Exzitotoxizität mit einem IC_{50} -Wert von 18,4 nM am stärksten. Die Substitution der Hydroxygruppe durch eine Methoxygruppe an Position C-7 führte zu einer um den Faktor 19 reduzierten inhibitorischen Aktivität (**26**: $IC_{50} = 360$ nM). Das 3-Benzazepin-Derivat **26b** mit einem 4-Phenylcyclohexyl-Rest zeigte mit einem IC_{50} -Wert von 12,1 μ M die schwächste Aktivität. Das ist im Vergleich zu **26a** eine 650-fach geringere inhibitorische Aktivität. Hingegen konnte keine signifikante Reduktion der Exzitotoxizität an L12-Zellen (NR1/NR2A) beobachtet werden. Es konnte somit gezeigt werden, dass alle drei 3-Benzazepin-Derivate

selektiv an NMDA-Rezeptoren mit NR2B-Untereinheiten antagonistisch wirken, nicht aber an solche mit NR2A-Untereinheiten. Auffällig ist dabei, dass alle drei Derivate ähnliche K_i -Werte besitzen, aber deutlich unterschiedliche IC_{50} -Werte im Exzitotoxizitäts-Assay aufweisen. Obwohl alle drei Derivate mit vergleichbarer Affinität an die Ifenprodil-Bindestelle binden, ist die intrinsische Aktivität (antagonistisch) unterschiedlich ausgeprägt. Mögliche unspezifische cytotoxische Effekte bzw. Löslichkeitsprobleme sowie eine direkte LDH-Inhibition konnten durch Kontrollexperimente ausgeschlossen werden. Auch bei den 3-Benzazepin-Derivaten muss durch weiterführende Untersuchungen abschließend die Frage geklärt werden, ob diese die Blut-Hirn-Schranke in therapeutisch relevanten Konzentrationen überwinden können. Darüber hinaus darf nicht außer Acht gelassen werden, dass klinisch tolerierbare NMDA-Antagonisten die normale glutamaterge Neurotransmission nicht oder nur wenig beeinflussen sollten.

5.2.2.5. Andere Reinsubstanzen

Im Rahmen des Screenings von Reinsubstanzen aus verschiedenen Substanzklassen im NMDA-Assay aus den Arbeitskreisen von Prof. Dr. Jochen Lehmann (Institut für Pharmazie, Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie, Friedrich-Schiller-Universität Jena) und Prof. Dr. Jörg Heilmann (Institut für Pharmazie, Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Universität Regensburg) waren drei Verbindungen aktiv. Dazu zählen Tacrin und dessen Derivat **28c** sowie ein 1,3-Diarylpyrazol-Derivat **36**. Diese zeigten eine signifikante Reduktion der Glutamat-vermittelten Exzitotoxizität an L12-Zellen (NR1/NR2A).

Tacrin konnte die Exzitotoxizität statistisch signifikant um 79 % ($p < 0,001$) bei einer Konzentration von 50 μ M reduzieren. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass Tacrin an Zellen mit einer NR2B-Untereinheit eine 10-fach geringere inhibitorische Aktivität aufweist. Die inhibitorische Aktivität von Tacrin ($IC_{50} = 4,9 \mu$ M) an Zellen mit einer NR2A-Untereinheit ist mit der von Memantin ($IC_{50} = 5,6 \mu$ M) vergleichbar. Geringfügig stärker wirkte das Tacrin-Analogon **28c** ($c = 50 \mu$ M, Hemmung 81,2 %, $p < 0,001$).

Es sind bereits mehrfach Hinweise auf neuroprotektive Effekte von Tacrin und Tacrin-Derivaten, insbesondere bivalenter Derivate bekannt. Li *et al.* (2005) beobachteten an primären cerebralen Ratten-Neuronen, dass der bivalente Acetylcholinesterase-Hemmer Bis(7)-tacrin (1,7-*N*-heptylen-bis-9,9'-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridin) die Glutamat-induzierte neuronale Apoptose durch Blockieren des NMDA-Rezeptors verhindert. Darüber

hinaus konnten Radioliganden-Verdrängungs-Experimente bestätigen, dass Bis(7)-tacrin durch Bindung an die MK-801-Bindungsstelle den Ionenfluss nachhaltig beeinflusst und damit die Exzitotoxizität hemmt. Die Bindungsaffinität war mit Memantin vergleichbar. Andere Acetylcholinesterase-Inhibitoren wie Donepezil zeigten keine inhibitorischen Effekte am NMDA-Rezeptor. Liu *et al.* (2008) konnten in ihren experimentellen Untersuchungen diese Ergebnisse bestätigen und zeigten, dass Bis(7)-Tacrin sogar potenter wirkt als Memantin. Allerdings scheint der neuroprotektive Effekt von Bis(7)-Tacrin nicht allein auf die Blockade des NMDA-Rezeptors zurückzuführen zu sein. Li *et al.* (2007) konnten eine Mitbeteiligung der neuronalen NO-Synthase (Stickstoffmonoxid-Synthase) nachweisen. Sie vermuteten, dass durch die synergistische Hemmung beider Zielstrukturen diese neuroprotektiven Effekte zustande kommen. In unseren Experimenten konnten wir eine Tacrin-abhängige Reduzierung der Exzitotoxizität ebenfalls nachweisen. Darüber hinaus wurde unter Tacrin-Behandlung eine 10-fach höhere inhibitorische Aktivität an L12-Zellen (NR2A-Untereinheit) im Vergleich zu L13-Zellen (NR2B-Untereinheit) beobachtet. In den oben beschriebenen Studien wurde die Subtyp-abhängige Blockade nicht untersucht. Andere Acetylcholinesterase-Inhibitoren wie Huperzin A, Galantamin und Rivastigmin zeigten im NMDA-Assay keine signifikante Reduktion der Exzitotoxizität. Die duale Wirksamkeit von Bis(7)-Tacrin als potenter AChE-Inhibitor und NMDA-Antagonist könnte eine interessante zukünftige Therapie-Option für AD-Patienten darstellen (Li *et al.* 2005). Einschränkend muss man erwähnen, dass Tacrin aufgrund seiner hepatotoxischen Wirkung als Arzneimittel keine Verwendung mehr findet (Schweiger 2008). Des Weiteren wurde auch bei Bis(7)-Tacrin eine hepatotoxische Wirkung festgestellt (Pan *et al.* 2007). Möglicherweise kann diese durch Veränderungen am Molekül unter Aufrechterhaltung der Wirksamkeit beseitigt werden.

Außer Tacrin und dessen Derivat **28** zeigte auch das 1,3-Diarylpyrazol-Derivat **36**, ein potentiell nichtsteroidales Antiinflammatorikum, eine signifikante aber schwächere Wirkung ($c = 50 \mu\text{M}$, Hemmung = 46 %, $p < 0,01$) am NMDA-Rezeptor (NR1/NR2A) im Vergleich zu Tacrin. Die Aktivität am NMDA-Rezeptor ist im Vergleich zu den Referenzen zu gering, deshalb wurde von einer weiteren Testung abgesehen.

5.2.2.6. Untersuchungen von Pflanzen-Extrakten zur Auffindung von biologisch aktiven Naturstoffen und ihrer pharmakologischen Aktivität am NMDA-Rezeptor

Die Gewinnung von Arzneistoffen aus Pflanzen und anderen Organismen ist eine alte und weitverbreitete Tradition. Ein aktueller Forschungsansatz ist die Kombination von traditioneller phytotherapeutischer Erfahrungsheilkunde (z. B. Traditionelle Chinesische Medizin, TCM) mit moderner Methodik (Chromatographie, Massenspektrometrie, Kernresonanzspektroskopie, pharmakologische Charakterisierung usw.). Damit hat man die Möglichkeit, Sekundärstoffe auch in niedrigen Konzentrationen in komplexen Extrakt-Matrizes zu detektieren, daraus zu isolieren und gegebenenfalls deren Struktur aufzuklären. Mit der Identifizierung und Gewinnung eines Pharmakophors und der Anwendung von Struktur-Wirkungsbeziehung können somit neue wirksame Substanzen bzw. neue Leitstrukturen gewonnen werden (Heilmann 2007).

TCM-Extrakte

Die Auswahl der zu testenden Extrakte aus der Traditionellen Chinesischen Medizin erfolgte nach dem indikationsbezogenen Gesichtspunkt ZNS-Störungen. Bei der Untersuchung von 22 Pflanzenextrakten aus 11 TCM-Drogen im NMDA-Assay wurden zwei aktive Extrakte mit antagonistischen Eigenschaften identifiziert. Beide Extrakte sind der getrockneten Krautdroge der Pflanze *Cynomorium songaricum* zuzuordnen. Sowohl der wässrige als auch der methanolische Auszug (TCM 7 M und TCM 7 W) hemmten im Screening konzentrationsabhängig die Exzitotoxizität an L12-Zellen (NR1/NR2A). Der wässrige, nach traditioneller Methodik hergestellte Extrakt ($c = 50 \mu\text{M}$, Hemmung = 93,6 %) war bei gleicher Konzentration etwas aktiver als der methanolische ($c = 50 \mu\text{M}$, Hemmung = 83,5 %). Eine möglich direkte LDH-Inhibition durch die Extrakte konnte in Kontrollexperimenten ausgeschlossen werden. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen zeigten Proanthocyanidine als Hauptbestandteile beider Extrakte. Diese könnten möglicherweise auch die wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffe sein. Dafür sprechen die Extrahierbarkeit mit polaren Lösungsmitteln, niedrige R_f -Werte bei Normalphasen-DC mit mittelpolaren Laufmitteln und die Anfärbbarkeit mit entsprechenden Nachweisreagenzien wie Vanillin-Salzsäure (Abbildung 50, Kapitel 4.2.2.2.).

Die Droge *Cynomorii herba* wird traditionell zur Behandlung von ZNS-Störungen insbesondere bei Paralyse (Lähmungen) und Parästhesien (schmerzhafte Empfindungen)

verwendet (Hempfen und Fischer 2007, Stöger und Friedl 2009), des Weiteren auch zur Linderung von Symptomen „des Alterns“ und bei Demenz (Lu *et al.* 2009). Als Inhaltsstoffe wurden Steroide (z. B. β -Sitosterol und Daucosterol), Triterpene (z. B. Ursolsäure) sowie Naringenin-4'-*O*-pyranoglucosid und weitere Flavonoide identifiziert. Darüber hinaus konnten Catechin, Bernsteinsäure, Palmitinsäure und verschiedene Lignane nachgewiesen werden (Tao *et al.* 1999, Jiang *et al.* 2001). Lu *et al.* (2009) konnten in *In-Vitro*-Experimenten neuroprotektive Effekte von *Cynomorium*-Extrakten an humanen SK-N-SH Neuroblastomzellen zeigen. Im Hinblick auf die gewonnenen Ergebnisse des Screenings von TCM-Extrakten im NMDA-Assay konnten wir ebenfalls neuroprotektive Effekte *in vitro* nachweisen. Angesichts der ausgeprägten Hydrophilie der Inhaltsstoffe ist eine Passage verschiedener Membransysteme der Zelle jedoch nur schwer vorstellbar. Mit unserem Testsystem lassen sich zwar Extrakte und Verbindungen mit hoher Affinität zum NMDA-Rezeptor finden, jedoch bedarf es anderer Modelle, um zu überprüfen, ob therapeutisch relevante Mengen zum Beispiel durch die Blut-Hirn-Schranke an den Wirkort gelangen.

Pflanzenextrakte der Vanuatu-Wildsammlung

Das Droгенаusgangsmaterial war Bestandteil einer Wildsammlung aus dem Jahre 2006, die nach Gesichtspunkten einer traditionellen Verwendung (potenziell immunomodulatorisch) im Inselstaat Vanuatu gesammelt worden waren (Bradacs 2008a). Häufig werden die nach ethnopharmazeutischer Fragestellung gesammelten Pflanzen nicht nur in Testsystemen mit Bezug zur Krankheit, sondern auch in vielen anderen Assays mit Verbindungen zu anderen Erkrankungen untersucht (Heilmann 2007). Deshalb wurden hier 63 Pflanzenextrakte auf ihre neuroprotektiven Eigenschaften in Hinblick auf antagonistische Aktivität im NMDA-Assay getestet.

Sechs Pflanzenextrakte zeigten eine statistisch signifikante inhibitorische Aktivität am NMDA-Rezeptor an L12-Zellen (NR2A-Untereinheit) (Kapitel 4.2.2.3.). Dazu zählten die methanolischen Extrakte von *Pipturus argenteus* (2766-1.9 C), *Syzygium malaccense* (3066-2 C), *Intsia bijuga* (2176-1 C), *Dracontomelon vitiense* (0186-12 C) sowie die Dichlormethan-Extrakte von *Baccaurea stylaris* (1786-6C A) und *Macaranga dioica* (2176-7L2 A). Als besonders aktiv ($c = 50 \mu\text{g/ml}$, Hemmung = 90 %) erwies sich der methanolische Extrakt von *Pipturus argenteus* WEDD. (2766-1.9 C). Aufgrund der hohen inhibitorischen Aktivität und einer geringen Cytotoxizität im Vergleich zu den anderen Extrakten wurde eine

Fraktionierung des methanolischen *Pipturus*-Extraktes durchgeführt, um wirksamkeitsbestimmende Inhaltsstoffe identifizieren zu können.

Aktive Fraktionen des *Pipturus*-Extraktes

Zur Isolierung und Identifizierung aktiver Komponenten wurde der methanolische *Pipturus*-Extrakt (2766-1.9 C) in mehreren Schritten fraktioniert. Nach jedem Trennschritt erfolgte eine Aktivitätsbestimmung im NMDA-Assay an L12-Zellen. Mit Hilfe der beschleunigten Lösungsmittlextraktion (ASE) konnten aus insgesamt 454 g gepulverter Droge (innere Rinde) 3,3 g Dichlormethan-Extrakt, 0,7 g Ethylacetat-Extrakt und 56,1 g Methanol-Extrakt gewonnen werden. Aufgrund des hohen Anteils an Proanthocyanidinen in den gewonnen Butanol- und Wasser-Fractionen wurde eine Trennung an Sephadex™ LH-20 vorgenommen. Die Elution erfolgte aufeinanderfolgend erst mit 70 % (V/V) Ethanol und dann mit 70 % (V/V) Aceton. Damit erzielt man eine Abtrennung von Flavonoiden und anderen Substanzen sowie die Fraktionierung in oligomere und polymere Procyanidine (Hänsel und Sticher 2010). Als aktive Sephadex-LH-20-Fractionen konnte ein Gemisch aus oligomeren und polymeren Procyanidine identifiziert werden. Diese Fractionen (B1.3, B1.4, C4.1, C4.2, C4.3, C4.4) zeigten im NMDA-Assay hohe inhibitorische Aktivität. Hingegen zeigt die Flavonoid-Fraktion C3.1 und die Fraction C2 keinerlei Aktivität. Somit sind vorrangig die oligomeren und polymeren Procyanidine als wirksamkeitsbestimmende Inhaltsstoffe anzusehen. Interessanterweise konnten für (+)-Catechin, (-)-Epicatechin sowie die Procyanidine B-1 und B-3 nur schwache bis keine Aktivitäten am NMDA-Rezeptor gemessen werden. Yazawa *et al.* (2006) zeigten in ihren experimentellen Untersuchungen eine Polyphenol-induzierte Neuroprotektion. Sie konnten nachweisen, dass die polyphenolische Verbindung Curcumin durch Modellierung des NMDA-Rezeptors die Glutamat-induzierte Exzitotoxizität hemmt. Des Weiteren zeigten sie protektive Effekte von (+)-Catechin. Nach ihren Vermutungen erfolgt diese Neuroprotektion nicht direkt am NMDA-Rezeptor, sondern ist mit der Caspase-3-Aktivität verknüpft. (+)-Catechin scheint die Aktivität der Caspase-3 direkt zu beeinflussen, und es verhindert bzw. hemmt somit die Apoptose der Zelle. In unseren Experimenten konnte unter (+)-Catechin-Behandlung ($c = 50 \mu\text{M}$) keine statistisch signifikante Reduzierung (Hemmung = 11,6 %) der Glutamat-induzierten Exzitotoxizität beobachtet werden.

Polyphenole können durch ihre Struktur vielfältig mit anderen Molekülen in Wechselwirkung treten, insbesondere mit Proteinen. Es wäre vorstellbar, dass die oligomeren Procyanidine

durch Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen an den Rezeptor binden und somit den übermäßigen Calcium-Einstrom verhindern. Ob dieser Vorgang auf spezifisch modifizierte Procyanidine zurückzuführen ist oder ob es sich eher um eine unspezifische Protein-Polyphenol-Interaktion handelt, müssten weiterführende Untersuchungen zeigen. Deshalb sind eine Trennung des Procyanidin-Gemisches und die Strukturaufklärung der Einzelsubstanzen angestrebt. Allerdings ist die Reinigung von Procyanidin-Makromolekülen nach ihrem Polymerisationsgrad technisch schwierig (Sasaki *et al.* 2009). Höhere Oligomere könnten durch Kombination von Abbaureaktion (Thiolyse), Rechromatographie und anschließender Analyse (NMR-Techniken) strukturell aufgeklärt werden. Abschließend stellt sich auch hier die Frage, ob diese Verbindungen die Membransysteme der Zelle überwinden können um ihre therapeutische Wirkung zu entfalten.

5.2.3. Der NMDA-Rezeptor als Target zur Behandlung der Alzheimer-Demenz – Ausblick

Wie bereits in der Einleitung (Kapitel 2.3.) dargelegt, kommt dem NMDA-Rezeptor eine wichtige Bedeutung in Bezug auf die Therapie der Alzheimer-Demenz zu. Momentan ist aber nur ein NMDA-Antagonist (Memantin) zur Behandlung der AD zugelassen. In den letzten Jahren wurden zwar einige neue NMDA-Rezeptor-Antagonisten entwickelt, diese zielgerichteten Entwicklungen waren aber therapeutisch weitestgehend erfolglos (Stark *et al.* 2000b). Die Komplexität der Bindungsstellen am Rezeptor bzw. seine Heterogenität eröffnet die Möglichkeit einer vielfältigen therapeutischen Beeinflussung. So zeigen Verbindungen der Ifenprodil-Reihe und Weiterentwicklungen wie die 3-Benzazepin-Derivate eine vielversprechende NR2B-Selektivität, um zu einer Verbesserung des Nutzen-Risikos-Potentials beizutragen. Die Suche nach neuen Leitstrukturen, zum Beispiel durch systematisches Screening in Hinblick auf ethnopharmazeutische und indikationsbezogene Gesichtspunkte, und deren systematischen Abwandlungen zur Optimierung ihrer Wirkprofile stellt ebenso eine wichtige Basis für die Entwicklung zukünftiger Arzneistoffe dar. Die hier durchgeführten Untersuchungen konnten zu einer Erweiterung der Erkenntnisse über den NMDA-Rezeptor beitragen. Durch systematisches Screening konnten wirksame bivalente β -Carbolin-Derivate und Pflanzenextrakte identifiziert werden.

Darüber hinaus wird dem NMDA-Rezeptor in neueren Assoziationsstudien eine größere Bedeutung in Hinblick auf genetischen Risiken zugesprochen. Möglicherweise gibt es einen

Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer *late-onset* Alzheimer-Demenz und einer veränderten NMDA-Rezeptor-Expression (Jiang und Jia 2009). In auffälligen Hirn-Arealen von AD-Patienten wurde ein signifikant geringeres mRNA-Transkriptionslevel von NR2A und NR2B nachgewiesen, das sich in Western-Blot-Analysen nachweisbar auf die Proteinexpression auswirkte (Hynd *et al.* 2004b). Jiang und Jia (2009) haben in ihren Analysen vier verschiedene Polymorphismen der Promotorregion des humanen NR2B-Untereinheiten-Gens (*GRIN2B*) bei chinesischen AD-Patienten und gesunden Probanden gefunden. Nach ihren Vermutungen scheint die Mutation -421C im Vergleich zu den anderen eine geringere transkriptionelle Aktivität des *GRIN2B*-Gens und damit eine geringe NR2B-Proteinexpression zu verursachen. Inwiefern dieser Sachverhalt mit dem Auftreten einer *late-onset* Alzheimer-Demenz in Verbindung steht, ist Gegenstand aktueller wissenschaftlicher Forschung. Diese Erkenntnisse stehen nicht im Widerspruch zur Entwicklung von NMDA-Rezeptor-Antagonisten, da diese nur den pathologischen Zustand der Überaktivierung des NMDA-Rezeptors durch Glutamat abfangen sollen, aber es unterstreicht die Bedeutung des NMDA-Rezeptors in Hinblick auf die Alzheimersche Krankheit.

5.3. ITS-Sequenzanalyse von *Pipturus argenteus* zur Identitätsprüfung

Die eindeutige Identifizierung von Arzneidroge(n)material ist eine notwendige Bedingung zur Qualitätssicherung. Gerade bei Wildsammlungen von Pflanzenmaterial kann die klassische morphologische Identitätsbestimmung mitunter schwierig sein und zu Verwechslungen führen, weil beispielsweise nicht alle Pflanzenteile vorhanden sind bzw. die Pflanze getrocknet wurde. Alternativ kann die Prüfung über eine molekulargenetische Sequenzanalyse der ITS-Region erfolgen. Die Variabilität der ITS-Bereiche ist dabei hoch genug, um phylogenetische Unterschiede innerhalb der Gruppe aufzuzeigen (Baldwin *et al.* 1995). Im Rahmen dieser Arbeit sollte die ITS-Sequenz von *P. argenteus* ermittelt werden, um deren Authentizität zu überprüfen und für mögliche neue Chargen des Drogenmaterials eine weitere alternative Identitätsprüfung zur Verfügung zu haben. Die Zuordnung zur Familie der Urticaceae konnte durch Datenbank-Abgleich der ermittelten Sequenz bestätigt werden. Die geringen Sequenzunterschiede zwischen *P. argenteus* und *P. albidus* lassen auf eine nahe Artverwandtschaft schließen, diese sind aber noch hoch genug um die beiden Arten voneinander abzugrenzen. Aufgrund dieser Ergebnisse können Pflanzen bzw.

Pflanzenteile in nachfolgenden Lieferungen zusätzlich zur botanischen Examinierung eindeutig molekulargenetisch identifiziert und zugeordnet werden. Diese genaue Identifizierung ist notwendig, um eine Reproduzierbarkeit der Isolierung von aktiven Naturstoffen zu gewährleisten.

6. Summary

Alzheimer's disease (AD) is a widespread, chronic and progressive neurodegenerative disorder of the central nervous system (CNS) with multifactorial causes. AD treatment is currently based on three different types of drugs: extracts from the leaves of *Ginkgo biloba*, acetylcholinesterase inhibitors, and the *N*-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) antagonist memantine. Genetic polymorphisms of the *APOE* gene are well-known risk factors for the sporadic late-onset AD and can be related to a wide variety of neuropathological processes. There are structural differences between the apolipoprotein E (ApoE) isoforms. ApoE4 is the least stable isoform and much more susceptible to fragmentation compared to ApoE2 and ApoE3. Because of its unique conformation and reactivity, ApoE4 forms many neurotoxic fragments. In the present study the synthetic tandem peptide ApoE(141-155)² showed significant toxic effects in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. A colorimetric bioassay was used to screen for protective effects against ApoE-induced toxicity. A protective effect was observed for methanolic extracts from the plants *Cynomorium songaricum* and *Pipturus argenteus*, as well as in fractions obtained after activity guided fractionation. These preliminary results suggest that the genetic risk factor *APOE*ε4 and associated ApoE-mediated neurotoxicity may be an interesting target for prophylaxis or therapy of sporadic late-onset AD.

The *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonist memantine is recommended for treatment of patients with moderate to severe AD. The therapeutic effect of memantine is thought to result from a reduction of glutamate-induced, Ca²⁺-mediated excitotoxicity in neurons of the CNS. In the present study a bioassay (NMDA assay) was established to screen for new NMDAR antagonists using L12-G10 and L13-E6 cell lines, which express the human NR1-1a/NR2A and NR1-1a/NR2B subunits of the NMDAR, respectively. Excitotoxicity measurement relied on the colorimetric quantification of lactate dehydrogenase released from damaged cells.

A total of 105 chemically defined compounds and 85 extracts from 29 plants were tested in the NMDA described assay. Novel homobivalent β-carboline derivatives, connecting two β-carboline units by alkylene spacers in two different series (N-2, N-9), showed strong inhibitory activities with IC₅₀ values comparable to memantine. The inhibitory activities of the homobivalent β-carboline compounds seemed to depend on the presence of two quaternary nitrogens, the spacer length, and the β-carboline structure. In contrast,

monovalent β -carboline, heterobivalent β -carboline/pyridine and homobivalent pyridine derivatives did not show any activity. Furthermore, NMDAR-inhibitory activity was observed for tacrine as well as derivatives of phencyclidine, flurbiprofen, 1,3-diarylpyrazole and tacrine. In addition, it has been shown that 3-benzazepine derivatives are NR2B-selective antagonists.

Eight of 85 plant extracts were found to inhibit to be reduction of glutamate-mediated excitotoxicity in the NMDA assay. Due to its high activity and low general cytotoxic potential, a methanolic extract of *Pipturus argenteus* was selected for activity-guided fractionation. The highest activity was found in a Sephadex-LH20 fraction probably consisting of oligomeric procyanidines. In future research, a further separation of this procyanidine mixture combined with a structure elucidation of single compounds is aspired.

The pathogenesis of AD is currently not completely understood. Given that AD is caused by multiple factors, further extensive research is required to develop novel treatments that can slow down the progression of the disease or improve symptoms such as memory loss. The novel homobivalent β -carboline derivatives possessed inhibitory activities on the NMDA receptor similar to the established NMDAR blocker memantine. Furthermore they are concurrently potent inhibitors of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes. Therefore, these compounds may represent interesting candidates drugs for the clinical development of new therapies against Alzheimer's disease.

7. Abkürzungen

SI-Einheiten werden nicht im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt. Gen-Namen und wissenschaftliche Bezeichnungen taxonomischer Gruppen sowie fremdsprachliche Fachbegriffe sind kursiv dargestellt.

A	Absorption
A β	Amyloid β
ACh	Acetylcholin
AChE-I	Acetylcholinesterase-Inhibitor
AD	Alzheimer-Demenz
AK	Arbeitskreis
ApoE	Apolipoprotein E
ApoE2/3/4	Apolipoprotein E, Isoform E2, E3 und E4
APP	<i>amyloid precursor protein</i> – Amyloid-Vorläuferprotein
AS	Aminosäure
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Arg	L-Arginin
BCh	Butyrylcholin
BChE-I	Butyrylcholinesterase-Inhibitor
3-BD	3-Benzazepin-Derivate
BLAST	<i>basic local alignment search tool, NCBI</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , bovines Serumalbumin „Fraktion V“
β -CD	β -Carbolin-Derivate
cDNA	<i>complementary DNA</i>
Ch	Charge
Da	Dalton (nicht SI-konforme Masse-Einheit)
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
Dex	Dexamethason
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphat (N = A, T, G, C)
DTT	Dithiothreitol
ECACC	<i>European Collection of Cell Cultures</i>
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N-N'-N'-tetraessigsäure
EtOH	Ethanol
EtOAc	Ethylacetat
FD	Fluoreszenzdetektion
FKS	fötales Kälberserum
FID	Flurbiprofen-Derivate
FM	Fließmittel Dünnschichtchromatographie

G/G	L-Glutaminsäure-Glycin-Lösung
GST	Glutathion-S-Transferase
HAT	Hypoxanthin Aminopterin Thymidin Medium
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
IC ₅₀	<i>inhibition concentration</i> , halbmaximale Hemmkonzentration
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
IQWiG	Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen
ITS	<i>internal transcribed spacer</i>
k. A.	keine Angabe
LDH	Lactatdehydrogenase
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
MEM	<i>Eagle's minimal essential medium</i>
MeOH	Methanol
MG	Molekulargewicht
MTC	Methylthioniumchlorid, Methylenblau
MTP	Mikrotiterplatte
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid
m/V	Masse pro Volumen
n. b.	nicht bestimmt
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
OD	Optische Dichte
p. a.	<i>pro analysi</i> , für die Analyse
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PP	Polypropylen
PS	Polystyrol
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RT	Raumtemperatur
RZPD	Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung, Berlin
SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
SK	Substanzkontrolle
SL	Stammlösung
ssdU-DNA	Einzelsträngige uracilhaltige DNA
TCA	Trichloressigsäure
TD	Tacrin-Derivate
TE	Tris-EDTA-Puffer
TK	Thymidinkinase
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>
V/V	Volumen pro Volumen
ZNS	Zentralnervensystem

8. Literaturverzeichnis

- Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K. (2002): Short protocols in molecular biology. *Wiley, UK*. 5th Edition.
- Bachurin S., Bukatina E., Lermontova N., Tkachenko S., Afanasiev A., Grigoriev V., Grigorieva I., Ivanov Y., Sablin S., Zefirov N. (2001): Antihistamine agent dimebon as a novel neuroprotector and a cognition enhancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 939: 425-435.
- Baldwin B. G., Sanderson M. J., Porter J. M., Wojciechowski M. F., Campbell C. S., Donoghue M. J. (1995): The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 82: 247-277.
- Bentahir M., Nyabi O., Verhamme J., Tolia A., Horre K., Wiltfang J., Esselmann H., De Strooper B. (2006): Presenilin clinical mutations can affect γ -secretase activity by different mechanisms. *Journal of Neurochemistry*. 96: 732-742.
- Benveniste M., Mayer M. L. (1993): Multiple effects of spermine on *N*-methyl-D-aspartic acid receptor responses of rat cultured hippocampal neurones. *The Journal of Physiology*. 464: 131-163.
- Berridge M. V., Tan A. S., McCoy K. D., Wang R. (1996): The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica*. 4: 14-19.
- Berthold H., Frorath B., Scanarini M., Abney C. C., Ernst B., Northemann W. (1992): Plasmid pGEX-5T: An alternative system for expression and purification of recombinant proteins. *Biotechnology Letters*. 14: 245-250.
- Bertram L., Tanzi R. E. (2008): Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta analyses. *Nature Reviews Neuroscience*. 9: 768-778.
- Biedler J. L., Helson L., Spengler B. A. (1973): Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Research*. 33: 2643-2652.
- Biedler J. L., Roffler-Tarlov S., Schachner M., Freedman L. S. (1978): Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Research*. 38 (11): 3751-3757.
- Boywitz K. (2009): Screening nach neuroprotektiven Substanzen und Pflanzenextrakten – Untersuchung zur Regulation von Apolipoprotein E. Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Bradacs G. (2008a): Ethnobotanical Survey and Biological Screening of Medical Plants from Vanuatu. Dissertation, Universität Regensburg.
- Bradacs G. (2008b): Herbal Medicine of Vanuatu. Regensburg.
- Bradford M. M. (1976): A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
- Brecht W. J., Harris F. M., Chang S., Tesseur I., Yu G.-Q., Xu Q., Fish J. D., Wyss-Coray T., Buttini M., Mucke L., Mahley R. W., Hunag Y. (2004): Neuron-specific apolipoprotein E4 proteolysis is associated with increased tau phosphorylation in brains of transgenic mice. *The Journal of Neuroscience*. 24: 2527-2534.
- Brouwers N., Slegers K., van Broeckhoven C. (2008): Molecular genetics of Alzheimer's disease: an update. *Annals of Medicine*. 40: 562-583.
- Bulic B., Pickhardt M., Schmidt B., Mandelkow E.-M., Waldmann H., Mandelkow E. (2009): Development of tau aggregation inhibitors for Alzheimer's Disease. *Angewandte Chemie Internationale Edition*. 48: 1740-1752.

- Cavalli A., Bolognesi M. L., Minarini A., Rosini M., Tumiatti V., Recanatini, Melchiorre C. (2008): Multi-target-directed ligands to combat neurodegenerative disease. *Journal of Medicinal Chemistry*. 51: 347-372.
- Cedazo-Mínguez A. (2007): Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 11: 1227-1238.
- Chang S., ran Ma T., Miranda R. D., Balestra M. E., Mahley R. W. (2005): Lipid- and receptor-binding regions of apolipoprotein E4 fragments act in concert to cause mitochondrial dysfunction and neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102: 18694-18699.
- Check E. (2002): Nerve inflammation halts trial for Alzheimer's drug. *Nature*. 415: 462.
- Chen H.-S. V., Pellegrini J. W., Aggarwal S. K., Lei S. Z., Warach S., Jensen F. E., Lipton S. A. (1992): Open channel block of NMDA responses by memantine: therapeutic advantage against NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *Journal of Neuroscience*. 12: 4427-4436.
- Chen H.-S. V., Lipton Stuart (2006): The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *Journal of Neurochemistry*. 97: 1611-1626.
- Collins M. A., Neafsey E. J., Matsubara K., Cobuzzi R. J. Jr, Rollema H. (1992): Indole-N-methylated beta-carbolinium ions as potential brain-bioactivated neurotoxins. *Brain Research*. 570: 154-160.
- Crutcher K. A., Clay M. A., Scott S. A., Tian X., Tolar M., Harmony J. A. K. (1994): Neurite degeneration elicited by apolipoprotein E peptides. *Experimental Neurology*. 130: 120-126.
- Csermely P., Ágoston V., Pongor S. (2005): The efficiency of multi-target drugs: the network approach might help drug design. *TRENDS in Pharmacological Sciences*. 26: 178-182.
- Cull-Candy S., Brickley S., Farrant M. (2001): NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Current Opinion. Neurobiology*. 11: 327-355.
- Cynis H., Scheel E., Saido T. C., Schilling S., Demuth H.-U. (2008): Amyloidogenic processing of amyloid precursor protein: Evidence of a pivotal role of glutaminyl cyclase in generation of pyroglutamate-modified amyloid- β . *Biochemistry*. 47: 7405-7413.
- Danysz W., Parsons C. G., Möbius H. J., Stöffler A., Quack G. (2000): Neuroprotective and symptomatological action of memantine relevant for Alzheimer's Disease - A unified glutamatergic hypothesis on the mechanism of action. *Neurotoxicity Research*. 2: 85-97.
- Darvesh S., Walsh R., Kumar R., Caines A., Roberts S., Magee D., Rockwood K., Martin E. (2003a): Inhibition of human cholinesterases by drugs used to treat Alzheimer Disease. *Alzheimer Disease & Associated Disorders an International Journal*. 17: 117-126.
- Darvesh S., Hopkins D. A., Geula C. (2003b): Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nature Reviews Neuroscience*. 4: 131-136.
- DeKosky S. T., Williamson J. D., Fitzpatrick A. L., Kronmal R. A., Ives D. G., Saxton J. A., Lopez O. L., Burke G., Carlson M. C., Fried L. P., Kuller L. H., Robbins J. A., Tracy R. P., Woolard N. F., Dunn L., Snitz B. E., Nahin R. L., Furberg C. D. (2008): *Ginkgo biloba* for prevention on dementia: A Randomized controlled trial. *Journal of the American Medical Association*. 300: 2253-2262.
- De Strooper B., Saftig P., Craessaerts K., Vanderstichele H., Guhde G., Annaert W., Von Figura K., Van Leuven F. (1998): Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature*. 391: 387-390.
- De Strooper B., Annaert W., Cupers P., Saftig P., Craessaerts K., Mumm J. S., Schroeter E. H., Schrijvers V., Wolfe M.S., Ray W. J., Goate A., Kopan R. (1999): A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature*. 398: 518-522.

- Dong L.-M., Weisgraber K. H. (1996): Human apolipoprotein E4 domain interaction. *The Journal of Biological Chemistry*. 271: 19053-19057.
- Doody R. S., Gavrilova S., Sano M., Thomas R., Aisen P., Bachurin S., Seely L., Hung D. (2008): Effect of dimebon on cognition, activities of daily living, behaviour, and global function in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *The Lancet*. 372: 207-215.
- Dravid S. M., Erreger K., Yuan H., Nicholson K., Le P., Lyuboslavsky, Almonte A., Murray E., Mosley C., Barber J., French A., Balster R., Murray T. F., Traynelis S. F. (2007): Subunit-specific mechanisms and proton sensitivity of NMDA receptor channel block. *The Journal of Physiology*. 581: 107-128.
- Du W., Aloyo V. J., Harvey J. A. (1997): Harmaline competitively inhibits [³H]MK-801 binding to the NMDA receptor in rabbit brain. *Brain Research*. 770: 26-29.
- Fleischer A. S., Raman R., Siemers E. R., Becerra L., Clark C. M., Dean R. A., Farlow M. R., Galvin J. E., Peskind E. R., Quinn J. F., Sherzai A., Sowell B. B., Aisen P. S., Thal L. J. (2008): Phase 2 safety trial targeting amyloid β production with a γ -secretase inhibitor in Alzheimer Disease. *Archives of Neurology*. 65: 1031-1038.
- Fonnum F., Fykse E.M., Roseth S. (1998): Uptake of glutamate into synaptic vesicles. *Progress in Brain Research*. 116: 87-101.
- Frangioni J. V., Neel B. G. (1993): Solubilization and purification of enzymatically active glutathion S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Analytical Biochemistry*. 210: 179-187.
- Friedhoff P., von Bergen M., Mandelkow E. M., Mandelkow E. (2000): Structure of tau protein and assembly into paired helical filaments. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1502 (1): 122-132.
- Frohne D., Jensen U. (1998): Systematik des Pflanzenreichs, 5. Auflage. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH*. Stuttgart.
- Geddes J. W., Tekirian T. L., Mattson M. P. (1999): N-terminus truncated beta amyloid peptides and C-terminus truncated secreted forms of amyloid precursor protein: distinct roles in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*. 20: 75-79
- Geerts H. (2007): Drug evaluation: (R)-flurbiprofen-an enantiomer of flurbiprofen for the treatment of Alzheimer's disease. *The Investigational Drugs Journal*. 10: 121-133.
- Gearhart D. A., Neafsey E. J., Collins M. A. (2002): Phenylethanolamine N-methyltransferase has beta-carboline 2N-methyltransferase activity: hypothetical relevance to Parkinson's disease. *Neurochemistry International*. 40: 611-620.
- Goederet M., Spillantini M. G., Potier M. G., Ulrich J., Crowther R. A. (1989): Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoforms of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNA in human brain. *The Embo Journal*. 8: 393-399.
- Gonçalves C., Dinis T., Batista M. T. (2005): Antioxidant properties of proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa* bark decoction: a mechanism for anti-inflammatory activity. *Phytochemistry*. 66: 89-98.
- Green R. C., Schneider L. S., Amato D. A., Beelen A. P., Wilcock G., Swabb E. A., Zavitz K. H. (2009): Effect of tarenflurbil on cognitive decline and activities of daily living in patients with mild Alzheimer Disease – A randomized controlled trial. *Journal of the American Medical Association*. 302: 2557-2564.
- Grimwood S., Le Bourdellés B., Attack J. R., Barton C., Cockett W., Cook S. M., Gilbert E., Hutson P. H., McKernan R. M., Myers J., Ragan C. I., Wingrove, Whiting P. J. (1996): Generation and characterisation of stable cell lines expressing recombinant human N-methyl-D-aspartate receptor subtypes. *Journal of Neurochemistry*. 66: 2239-2247.

- Guillozet A. L., Smiley J. F., Mash D. C., Mesulam M. M. (1997): Butyrylcholinesterase in the life cycle of amyloid plaques. *Annals of Neurology*. 42: 909-918.
- Gura T. (2008): Hope in Alzheimer's fight emerges from unexpected places. *Nature Medicine*. 14: 984.
- Gyure K. A., Durham R., Stewart W. F., Smialek J. E., Troncoso J. C. (2001): Intraneuronal $\alpha\beta$ -amyloid precedes development of amyloid plaques in Down syndrome. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. 125: 489-492.
- Haass C., Selkoe D. J. (2007): Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 8: 101-112.
- Hamann J., Wernicke C., Lehmann J., Reichmann H., Rommelspacher H., Gille G. (2008): 9-Methyl-beta-carboline up-regulates the appearance of differentiated dopaminergic neurones in primary mesencephalic culture. *Neurochemistry International*. 52: 688-700.
- Han X., Tomitori H., Mizuno S., Higashi K., Füll C., Fukiwake T., Terui Y., Leewanchi P., Nishimura K., Toida T., Williams K., Kashiwagi K., Igarashi K. (2008): Binding of spermine and ifenprodil to a purified, soluble regulatory domain of N-methyl-D-aspartate receptor. *Journal of Neurochemistry*. 107: 1566-1577.
- Hanahan D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*. 166: 557-580.
- Handelmann G. E., Boyles J. K., Weisgraber K. H., Mahley R. W., Pitas R. E. (1992): Effects of apolipoprotein E, beta-very low density lipoproteins, and cholesterol on the extension of neurites by rabbit dorsal root ganglion neurons in vitro. *Journal of Lipid Research*. 33: 1677-1688.
- Hänsel R., Sticher O. (2010): Pharmakognosie – Phytopharmazie, 9. Auflage. *Springer Medizin Verlag Heidelberg*.
- Hardy J. A., Higgins G. A. (1992): Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*. 256: 184-185.
- Harrington C., Rickard J. E., Horsley D., Harrington K. A., Hindley K. P., Riedel G., Theuring F., Seng. M. K., Wischik C. M. (2008): Methylthioninium chloride (MTC) acts as a Tau aggregation inhibitor (TAI) in a cellular model and reverses Tau pathology in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *International Conference on Alzheimer's and Dementia*. Abstract O1-06-04.
- Harris F. M., Brecht J. W., Xu Q., Tesseur I., Kekonius L., Wyss-Coray T., Fish J. D., Masliah E., Hopkins P. C., Scearce-Levie K., Weisgraber K. H., Mucke L., Mahley R. W., Huang Y. (2003): Carboxyl-terminal-truncated apolipoprotein E4 causes Alzheimer's disease-like neurodegeneration and behavioral deficits in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100: 10966-10971.
- Hashimoto Y., Jiang H., Niikura T., Ito Y., Hagiwara A., Umezawa K., Abe Y., Murayama Y., Nishimoto I. (2000): Neuronal apoptosis by apolipoprotein E4 through low-density lipoprotein receptor-related protein and heterotrimeric GTPases. *Journal of Neuroscience*. 20: 8401-8409.
- Heilmann J. (2007): Wirkstoffe auf Basis biologisch aktiver Naturstoffe. *Chemie in unserer Zeit*. 41: 376-389.
- Hempfen C. H., Fischer T. (2007): Leitfaden Chinesische Phytotherapie, 2. Auflage, München. *Elsevier GmbH*.
- Herraiz T., González D., Ancín-Azpilicueta C., Arán V. J., Guillén H. (2010): beta-Carboline alkaloids in *Peganum harmala* and inhibition of human monoamine oxidase (MAO). *Food and Chemical Toxicology*. 48: 839-845.

- Heun R., Kölsch H. (2003): Genetik der Alzheimer Demenz. *Psychoneuro*. 29: 175-178.
- Holmes C., Boche D., Wilkinson D., Yadegarfar G., Hopkins V., Bayer A., Jones R. W., Bullock R., Love S., Neal J. W., Zotova E., Nicoll J. A. (2008): Long-term effects of abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *Lancet*. 372: 216-223.
- Holtzman D. M., Fagan A. M. (1998): Potential Role of apoE in Structural Plasticity in the Nervous System – Implications for Disorders of the Central Nervous System. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 8: 250-255.
- Holzgrabe U., Kapková P., Alptüzün V., Scheiber J., Kugelmann E. (2007): Targeting acetylcholinesterase to treat neurodegeneration. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 11: 161-179.
- Huang Y., Liu X. Q., Wyss-Coray T., Brecht W. J., Sanan D. A., Mahley R. W. (2001): Apolipoprotein E fragments present in Alzheimer's Disease brains induce neurofibrillary tangle-like intracellular inclusions in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98: 8838-8843.
- Huang Y., Weisgraber K. H., Mucke L., Mahley R. W. (2004): Apolipoprotein E: Diversity of cellular origins, structural and biophysical properties, and effects in Alzheimer's Disease. *Journal of Molecular Neuroscience*. 23: 189-240.
- Hynd M. R., Scott H. L., Dodd P. R. (2004a): Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*. 45: 583-595.
- Hynd M. R., Scott H. L., Dodd P. R. (2004b): Differential expression of N-methyl-D-aspartate receptor NR2 isoforms in Alzheimer's Disease. *Journal of Neurochemistry*. 90: 913-919.
- Inouye H., Sharma D., Goux W. J., Kirschner D. A. (2006): Structure of core domain of fibril-forming PHF/Tau fragments. *Biophysical Journal*. 90: 1774-1789.
- Iqbal K., Grundke-Iqbal I. (2008): Alzheimer neurofibrillary degeneration: significance, etiopathogenesis, therapeutics and pervention. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 12: 38-55.
- IQWiG (2007): Cholinesterasehemmer bei Alzheimer Demenz. *Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen*. Köln, Abschlussbericht Nr. 17 (A05-19A).
- IQWiG (2008): Ginkgohaltige Präparate bei Alzheimer Demenz. *Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen*. Köln, Abschlussbericht Nr. 39 (A05-19B).
- IQWiG (2009): Memantin bei Alzheimer Demenz. *Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen*. Köln, Abschlussbericht Nr. 59 (A05-19C).
- Ishigami M., Swertfeger D. K., Granholm N. A., Hui D. Y. (1998): Apolipoprotein E inhibits platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell migration and proliferation by suppressing signal transduction and preventing cell entry to G1 phase. *Journal of Biological Chemistry*. 273: 20156-20161.
- Jiang Z.-H., Tanaka T., Sakamoto M., Jiang T., Kouno I. (2001): Studies on a medicinal parasitic plant: Lignans from the Stem of *Cynomorium songaricum*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 49: 1036-1038.
- Jiang H., Jia J. (2009): Association between NR2B subunit gene (*GRIN2B*) promotor polymorphisms and sporadic Alzheimer's disease in the North Chinese population. *Neuroscience Letters*. 450: 356-360.
- Jick H., Zornberg G., Jick S., Seshadri S., Drachman D. (2000): Statins and risk of dementia. *The Lancet*. 356: 1627-1631.

- Johnson G. V. W., Stoothoff W. H. (2004): Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *Journal of Cell Science*. 117: 5721-5729.
- Jordan J., Galindo M. F., Miller R. J., Reardon C. A., Getz G. S., LaDu M. J. (1998): Isoform-specific effect of apolipoprotein E on cell survival and β -Amyloid-induced toxicity in rat hippocampal pyramidal neuronal cultures. *Journal of Neuroscience*. 18: 195-204.
- Kartika H., Li Q. X., Wall M. M., Nakamoto S. T., Iwaoka W. T. (2007): Major phenolic acids and total antioxidant activity in Mamaki leaves, *Pipturus albidus*. *Journal of Food Science*. 72: S696-S701.
- Katz I. R., Jeste D. V., Mintzer J. E., Clyde C., Napolitano J., Brecher M. (1999): Comparison of risperidone and placebo for psychosis and behavioral disturbances associated with dementia: A randomized, double-blind trial. *The Journal of Clinical Psychiatry*. 60: 107-115.
- Keller J. N. (2006): Age-related neuropathology, cognitive decline, and Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews*. 5: 1-13.
- Kew J. N., Kemp J. A. (2005): Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology*. 179: 4-29.
- Kit S., Dubbs D. R., Piekarski L. J., Hsu T. C. (1963): Deletion of thymidine kinase activity from L cells resistant to bromodeoxyuridine. *Experimental Cell Research*. 31: 297-312.
- Klebe R. J., Harris J. V., Sharp Z. D., Douglas M. G. (1983): A general method for polyethylene-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast. *Gene*. 25 (2-3): 333-341.
- Kronhuber J., Bormann J., Retz W., Hübers M., Riederer P. (1989): Memantine displaces [3 H]MK-801 at therapeutic concentrations in postmortem human frontal cortex. *European Journal of Pharmacology*. 166: 589-590.
- Kunkel T. A. (1985): Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 82: 488-492.
- Laemmli U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Lahiri D. K. (2004): Apolipoprotein E as a target for developing new therapeutics for Alzheimer's Disease based on studies from protein, RNA, and regulatory region of the gene. *Journal of Molecular Neuroscience*. 23: 225-233.
- Lee V. M., Goedert M., Trojanowski J. Q. (2001): Neurodegenerative tauopathies. *Annual Review of Neuroscience*. 24: 1121-1159.
- Li W., Pi R., Chan H. H. N., Fu H., Lee N. T. K., Tsang H. W., Pu Y., Chang D. C., Li C., Luo J., Xiong K., Li Z., Xue H., Carlier P. R., Pang Y., Tsim K. W. K., Li M., Han Y. (2005): Novel dimeric acetylcholinesterase inhibitor bis(7)-tacrine, but not donepezil, prevents glutamate-induced neuronal apoptosis by blocking N-methyl-D-aspartate receptors. *Journal of Biological Chemistry*. 280: 18179-18188.
- Li W., Xue J., Niu C., Fu H., Lam C. S. C., Luo J., Chan H. H. N., Xue H., Kan K. W., Lee N. T. K., Li C., Pang Y., Li M., Tsim K. W. K., Jiang H., Chen K., Li X., Han Y. (2007): Synergistic neuroprotection by bis(7)-tacrine via concurrent blockade of N-Methyl-D-aspartate receptors and neuronal nitric-oxide synthase. *Molecular Pharmacology*. 71: 1258-1267.
- Liu Y.-W., Li C.-Y., Lou J.-L., Li W.-M., Fu H.-J., Lao Y.-Z., Liu L.-J., Pang Y.-P., Chang D. C., Li Z.-W., Peoples R. W., Ai Y.-X., Han Y.-F. (2008): Bis(7)-tacrine prevents glutamate-induced excitotoxicity more potently than memantine by selectively inhibiting NMDA receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 369: 1007-1011.

- Lipton S. A. (2006): Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: Memantine and beyond. *Nature reviews*. 5: 160-170.
- Lleo A., Galea E., Sastre M. (2007): Molecular targets of non-steroidal anti-inflammatory drugs in neurodegenerative diseases. 64: 1403-1418.
- Locher C. P., Burch M. T., Mower H. F., Berestecky J., David H., Van Poel B., Lasure A., Vanden Berghe D. A., Vlietnick A. J. (1995): Anti-microbial activity and anti-complement activity of extracts obtained from selected Hawaiiin medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 49: 23-32.
- Lu Y., Wang Q., Melzig M. F., Jenett-Siems K. (2009): Extracts of *Cynomorium songaricum* protect SK-N-SH human neuroblastoma cells against staurosporine-induced apoptosis potentially through their radical scavenging Activity. *Phytotherapy Research*. 23: 257-261.
- Maher P., Davis J. B. (1996): The role of monoamine metabolism oxidative glutamate toxicity. *Journal of Neuroscience*. 16: 6394-6401.
- Mahley R. (1988): Apolipoprotein E: Cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*. 240: 622-630.
- Mahley R. W., Weisgraber K. H., Huang Y. (2006): Apolipoprotein E4: A causative factor and therapeutic target in neuropathology including Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103: 5644-5651.
- Marques M. A., Tolar M., Harmony J. A., Crutcher K. A. (1996): A thrombin cleavage fragment of apolipoprotein E exhibits isoform-specific neurotoxicity. *NeuroReport*. 7: 2529-2532.
- Marques M. A., Crutcher K. A. (2003): Apolipoprotein E-related neurotoxicity as a therapeutic target for Alzheimer's Disease. *Journal of Molecular Neuroscience*. 20: 327-337.
- Maslow K., Alzheimer's Association (2008): 2008 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*. 4: 110-133.
- Massoulié J., Anselmet A., Bon S., Krejci E., Legay C., Morel N., Simon S. (1998): Acetylcholinesterase: C-terminal domains, molecular forms and functional localization. *Journal of Physiology-Paris*. 92: 183-190.
- Menzel H. J., Kladetzky R. G., Assmann G. (1983): Apolipoprotein E polymorphism and coronary artery disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 3: 310-315.
- Michikawa M., Fan Q.-W., Isobe I., Yanagisawa K (2000): Apolipoprotein E Exhibits Isoform-Specific Promotion of Lipid Efflux from Astrocytes and Neurons in Culture. *Journal of Neurochemistry*. 74: 1008-1016.
- Mills J., Reiner P. B. (1999): Regulation of amyloid precursor protein cleavage. *Journal of Neurochemistry*. 72: 443-460.
- Misra A., Ganesh S., Shahiwala A., Shah S. P. (2003): Drug delivery to the central nervous system: a review. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Science*. 6: 252-273.
- Mitchell D. A., Marshall T. K., Deschenes R. J. (1993): Vectors for the inducible overexpression of glutathione S-transferase fusion proteins in yeast. *Yeast*. 9: 715-723.
- Mody I., MacDonald J. (1995): NMDA-receptor-dependent excitotoxicity: the role of intracellular Ca^{2+} release. *Trends in Pharmacological Sciences*. 16: 356-359.
- Mony L., Kew J. N. C., Gunthorpe M. J., Paoletti P. (2009): Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors: molecular mechanisms and therapeutic potential. *British Journal of Pharmacology*. 157: 1301-1317.
- Mosmann T. (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay. *Journal Immunological Methods*. 65: 55-63.

- Moulder K. L., Narita M., Chang L. K., Bu G., Johnson Jr. E. M. (1999): Analysis of a novel mechanism of neuronal toxicity produced by an apolipoprotein E-derived peptide. *Journal of Neurochemistry*. 72: 1069-1080.
- Moura D. J., Rorig C., Vieira D. L., Henriques J. A. P., Roesler R., Saffi J., Boeira J. M. (2006): Effects of β -carboline alkaloids on the object recognition task in mice. *Life Sciences*. 79:2099-2104.
- Müller W. E., Abdel-Kader R., Fehske C. J., Leuner K. (2009): Grundlagen der therapeutischen Anwendung von EGb 761®. *Pharmazie in unserer Zeit*. 38: 408-416.
- Mutschler E., Geisslinger G., Kroemer H. K., Schäfer-Korting (2001): Mutschler Arzneimittelwirkung – Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, 8. Auflage. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart*.
- Nanjo F., Mori M., Goto K., Hara Y. (1999): Radical scavenging activity of tea catechins and their related compounds. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 63: 1621-1623.
- Nishi M., Hinds H., Lu H.-P., Kawata M., Hayashi Y. (2001): Motoneuron-specific expression of NR3B, a novel NMDA-type glutamate receptor subunit that works in a dominant-negative manner. *The Journal of Neuroscience*. 21 (RC185): 1-6.
- Osakabe K., Tsao C. C., Li L., Popko J. L., Umezawa T., Carraway D. T., Smeltzer R. H., Joshi C. P., Chiang V. L. (1999): Coniferyl aldehyde 5-hydroxylation and methylation direct syringyl lignin biosynthesis in angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 96: 8955-8960.
- Ozawa S., Kamiya H., Tsuzuki K. (1998): Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress Neurobiology*. 54: 581-618.
- Pan S. Y., Yu Z. I., Dong H., Lee N. T., Wang H., Fong W. F., Han Y. F., Ko K. M. (2007): Evaluation of acute bis(7)-tacrine treatment on behavioral functions in 17-day-old and 30-day-old mice, with attention to drug toxicity. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 86: 778-783.
- Pang Y. P., Quiram P., Jelacic T., Hong F., Brimijoin S. (1996): Highly potent, selective, and low cost bis-tetrahydroaminacrine inhibitors of acetylcholinesterase – Steps toward novel drugs for treating Alzheimer's disease. *Journal of Biological Chemistry*. 271: 23646-23649.
- Paoletti P., Ascher P., Neyton J. (1997): High-affinity zinc inhibition of NMDA NR1-NR2A receptors. *The Journal of Neuroscience*. 17: 5711-5725.
- Paoletti P., Neyton J. (2007): NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Current Opinion in Pharmacology*. 7: 39-47.
- Parson C. G., Danysz W., Bartmann A., Spielmann P., Frankiewicz T., Hesselink M., Eilbacher B., Quack G. (1999): Amino-alkyl-cyclohexanes are novel uncompetitive NMDA receptor antagonists with strong voltage-dependency and fast blocking kinetics: in vitro and in vivo characterization. *Neuropharmacology*. 38: 85-108.
- Paterson N. E., Malekiani S. A., Foreman M. M., Olivier B., Hanania T. (2009): Pharmacological characterization of harmaline-induced tremor activity in mice. *European Journal of Pharmacology*. 616: 73-80.
- Phillips T. A., VanBogelen R. A., Neidhardt F. C. (1984): Ion gene product of *Escherichia coli* is a heat-shock protein. *Journal of Bacteriology*. 159: 283-287.
- Rall S. C., Weisgraber K. H., Mahley R. W. (1986): Isolation and characterization of apolipoprotein E. *Methods in Enzymology*. 128: 273-287.
- Rasmussen T. H., Nielsen J. B. (2002): Critical parameters in the MCF-7 cell proliferation bioassay (E-Screen). *Biomarkers*. 7: 322-326.

- Reynolds I. J., Miller R. J. (1989): Ifenprodil is a novel type of N-methyl-D-aspartate receptor antagonist: interaction with polyamines. *Molecular Pharmacology*. 36: 758-765.
- Richartz-Salzbunger E. (2007): Psychoimmunologische Forschung bei Alzheimer-Demenz – Die Hypothese vorzeitiger Immunalterung als pathogenetischer Faktor. *Steinkopff Verlag*. Volume 14: 9-19.
- Robert Koch-Institut (2009): Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Heft 48. Berlin, *Robert Koch-Institut*.
- Roche Diagnostics (2005a): Cell Proliferation Kit I (MTT), Package Insert, Version 09/2005. Mannheim, *Roche Diagnostics*.
- Roche Diagnostics (2005b): Cytotoxicity Detection Kit I (LDH), Package Insert, Version 07/2005. Mannheim, *Roche Diagnostics*.
- Rock D. M., MacDonald R. L. (1992): Spermine and related polyamines produce a voltage-dependent reduction of N-methyl-D-aspartate receptor single-channel conductance. *Molecular Pharmacology*. 42: 157-164.
- Rook Y. (2009): β -Carboline als potentielle Arzneistoffe oder endogene Neurotoxine bei neurodegenerativen Erkrankungen: Analytik, Synthese, Pharmakologie. Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Roth M., Mountjoy C. Q., Amrein R. (1996): Moclobemide in elderly patients with cognitive decline and depression: An international double-blind, placebo-controlled trial. *The British Journal of Psychiatry*. 168: 149-157.
- Rothman S. M., Olney J. (1987): Excitotoxicity and NMDA receptor. *Trends in Neuroscience*. 10: 299-302.
- Russo C., Saido T. C., DeBusk L. M., Tabaton M., Gambetti P., Teller J. K. (1997): Heterogeneity of water-soluble amyloid beta-peptide in Alzheimer's disease and Down's syndrome brains. *Federation for the Federation of European Biochemical Societies Letters*. 409: 411-416.
- Sabbagh M. N., Shill H. A. (2010): Latrepirdine, a potential novel treatment for Alzheimer's disease and Huntington's chorea. *Current Opinion in Investigational Drugs*. 11: 80-91.
- Sadowski M. J., Pankiewicz J., Scholtzova H., Metha P. D., Prelli F., Quartermain D., Wisniewski T. (2006): Blocking the apolipoprotein E/amyloid- β interaction as a potential therapeutic approach for Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 103: 18787-18792.
- Sambrook J., Russell D. (2001): Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*. Third Edition.
- Sasaki K., Matsukura Y., Shijima K., Miyake M., Fujiwara D., Konishi Y. (2009): High-Performance Liquid Chromatographic Purification of Oligomeric Procyanidins, Trimers up to Nonamers, Derived from the Bark of Jatoba (*Hymenaea courbaril*). *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 73: 1274-1279.
- Sato M., Toyazaki H., Yoshioka Y., Yokoi N., Yamasaki T. (2010): Structural characteristics for superoxide anion radical scavenging and productive activities of green tea polyphenols including proanthocyanidin dimers. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 58: 98-102.
- Sayre L. M., Wang F. J., Arora P. K., Riachi N. J., Harik S. I., Hoppel C. L. (1991): Dopaminergic neurotoxicity in vivo and inhibition of mitochondrial respiration in vitro by possible endogenous pyridinium-like substances. *Journal of Neurochemistry*. 57: 2106-2115.
- Schein C. H. (1991): Optimizing protein folding to the native state in bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*. 2: 746-750.

- Schenk D., Barbour R., Dunn W., Gordon G., Grajedes H., Guido T., Hu K., Huang J., Johnson-Wood K., Khan K., Kholodenko D., Lee M., Liao Z., Lieberburg I., Motter R., Mutter L., Soriano F., Shopp G., Vasquez N., Vandeventer C., Walker S., Wogulis M., Yednock T., Games D., Seubert P. (1999): Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*. 400: 173-177.
- Schilling S., Zeitschel U., Hoffmann T., Heiser U., Francke M., Kehlen A., Holzer M., Hutter-Paier B., Prokesch M., Windisch M., Jagala W., Schlenzig D., Lindner C., Rudolph T., Reuter G., Cynis H., Montag D., Demuth H.-U., Rossner S. (2008): Glutaminyl cyclase inhibition attenuates pyroglutamate A β and Alzheimer's disease-like pathology. *Nature Medicine*. 14: 1106-1111.
- Schindowski K., Leutner S., Kressmann S., Eckert A., Müller W. E. (2001): Age-related increase of oxidative stress-induced apoptosis in mice Prevention by *Ginkgo biloba* extract (EGb761). *Journal of Neural Transmission*. 108: 969-978.
- Schweiger H.-D. (2008): Antidementiva gegen den schleichenden Abbau. *Pharmazeutische Zeitung*. 34: 12-18.
- Sergeant N., Bombois S., Ghestem A., Drobercq H., Kostanjevecki V., Missiaen C., Wattez A., David J. P., Vanmechelen E., Sergheraert C., Delacourte A. (2003): Truncated beta-amyloid peptide species in pre-clinical Alzheimer's disease as new targets for the vaccination approach. *Journal of Neurochemistry*. 85: 1581-1591.
- Smith A., Glunta B., Bickford P. C., Fountain M., Tan J., Shytle R. D. (2010): Nanolipidic particles improve the bioavailability and alpha-secretase inducing ability of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) for the treatment of Alzheimer's Disease. *International Journal of Pharmaceutics*. 389: 207-212.
- Shore V. G., Shore B. (1973): Heterogeneity of human plasma very low density lipoprotein. Separation of species differing in protein components. *Biochemistry*. 12: 502-507.
- Skerry T.M., Genever P.G. (2001): Glutamate signalling in non-neuronal tissues. *Trends Pharmacological Science*. 22: 174-81.
- Snitz B. E., O'Meara E. S., Carlson M. C., Arnold A. M., Ives D. G., Rapp S. R., Saxton J., Lopez O. L., Dunn L. O., Sink K. M., DeKosky S. T. (2009): *Ginkgo biloba* for preventing cognitive decline in older adults: A randomized trial. *Journal of the American Medical Association*. 302: 2663-2670.
- Stanley C. R. Jr., Weisgraber K. H., Mahley R. W. (1986): Isolation and characterization of apolipoprotein E. *Methods in Enzymology*. 128: 273-287.
- Stark H., Graßmann S., Reichert U. (2000a): Struktur, Funktion und potentielle therapeutische Bedeutung von NMDA-Rezeptoren – Teil 2: Architektur und Modulation der Rezeptoren. *Pharmazie in unserer Zeit*. 29: 228-236.
- Stark H., Graßmann S., Reichert U. (2000b): Struktur, Funktion und potentielle therapeutische Bedeutung von NMDA-Rezeptoren – Teil 2: Therapiekonzepte und neue Rezeptorliganden. *Pharmazie in unserer Zeit*. 29: 228-236.
- Steinmetz R. D., Fava E., Nicotera P., Steinhilber D. (2002): A simple cell line based in vitro system for N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor ligands. *Journal of Neuroscience Methods*. 113: 99-110.
- Stephenson F. A. (2001): Subunit characterization of NMDA receptors. *Current Drug Targets*. 2: 233-239.
- Stern Y., Gurland B., Tatemichi T. K., Tang M. X., Wilder D., Mayeux R. (1994): Influence of education and occupation on the incidence of Alzheimer's disease. *Journal of the American Medical Association*. 271: 1004-1010.
- Strandberg L., Enfors S. O. (1991): Factors influencing inclusion body formation in the production of a fused protein in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 57: 1669-1674.

- Tamai I., Tsuji A. (2000): Transporter-mediated permeation of drugs across the blood-brain-barrier. *Journal of Pharmaceutical Science*. 89: 1371-1388.
- Tang C.-M., Dichter M., Morad M. (1990): Modulation of the *N*-methyl-D-aspartate channel by extracellular H⁺. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 87: 6445-6449.
- Tao J., Tu P., Xu W. Chen D. (1999): Studies on chemical constituents and pharmacological effects of stem of *Cynomorium songaricum* Rupr. *China Journal of Chinese Materia Medica*. 24: 292-4, 318-9.
- Tewes B., Frehland B., Schepmann D., Schmidtke K. U., Winckler T., Wünsch B. (2010): Design, synthesis, and biological evaluation of 3-Benzazepin-1-ols as NR2B-selective NMDA receptor antagonists. *ChemMedChem*. 5: 687-695.
- Tolar M., Marques M. A., Harmony A. K., Crutcher K. A. (1997): Neurotoxicity of the 22 kDa thrombin-cleavage fragment of apolipoprotein and related synthetic peptides is receptor-mediated. *The Journal of Neuroscience*. 17: 5678-5686.
- Tolar M., Keller J. N., Chan S., Mattson M. P., Marques M. A., Crutcher K. A. (1999): Truncated apolipoprotein E (ApoE) causes increased intracellular calcium and may mediate ApoE neurotoxicity. *The Journal of Neuroscience*. 19: 7100-7110.
- Town T. (2009): Alternative A β immunotherapy approaches for Alzheimer's Disease. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*. 8: 114-127.
- Tsai S. J., Liu H.-C., Liu T.-Y., Cheng C.-Y. and Hong C.-J. (2002): Association analysis for genetic variants of the NMDA receptor 2b subunit (GRIN2B) and Parkinson's disease. *Journal Neural Transmission*. 109: 483-488.
- Ude C., Paulke A., Schubert-Zsilavecz, Wurglics M. (2009): Chemie, Pharmakokinetik und Metabolismus von Ginkgo-Extrakt. *Pharmazie in unserer Zeit*. 38 (5): 418-423.
- Utermann G., Hees M., Steinmetz A. (1977): Polymorphism of Apolipoprotein E and occurrence of dysbetalipoproteinaemie in man. *Nature*. 269: 604-607.
- Utermann G., Steinmetz A., Weber W. (1982): Genetic control of human apolipoprotein polymorphism comparison of one- and two-dimensional techniques of isoprotein analysis. *Human Genetics*. 60: 344-351.
- Vance J. E., Hayashi H., Karten B. (2005): Cholesterol homeostasis in neurons and glia cell. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 16: 193-212.
- Vieira J., Messing J. (1987): Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods in Enzymology*. 153: 3-11.
- Weickert M. J., Doherty D. H., Best E. A., Olins P. O. (1996): Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*. 7 (5): 494-499.
- Weingarten M. D., Lockwood A. H., Hwo S. Y., Kirschner M. W. (1975): A protein factor essential for microtubule assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 72: 1858-1862.
- Weisgraber K. H., Innerarity T. L., Rall S. C. Jr., Mahley R. W. (1985): Apolipoprotein E: receptor binding properties. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 183: 159-171.
- Weksler M. E., Gouras G., Relkin N. R., Szabo P. (2005): The immune system, amyloid-beta peptide, and Alzheimer's disease. *Immunological Reviews*. 205: 244-256.
- Weyerer S. (2005): Heft 28 – Altersdemenz. Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Berlin. *Robert Koch Institut*.
- Whalley L. J., Deary I. J., Appleton C. L., Starr J. M. (2004): Cognitive reserve and the neurobiology of cognitive aging. *Ageing Research Reviews*. 3: 369-382.

- Williams K. (1993): Ifenprodil discriminates subtype of *N*-methyl-D-aspartate receptor-selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. *Molecular Pharmacology*. 44: 851-859.
- Williams K. (1994): Mechanisms influencing stimulatory effects of spermine at recombinant *N*-methyl-D-aspartate receptors. *Molecular Pharmacology*. 46: 161-168.
- Williams K. (1997): Modulation and Block of Ion Channel: A new biology of polyamines. *Cellular Signalling*. 9: 1-13.
- Wirth U., Schepmann D., Wunsch B. (2007): Asymmetric synthesis of 1-substituted tetrahydro-3-benzazepines as NMDA receptor antagonists. *European Journal of Organic Chemistry*. 2007: 462-475.
- Wirths O., Multhaup G., Czech C., Blanchard V., Moussaoui S., Tremp G., Pradier L, Beyreuther K., Bayer T. A. (2001): Intraneuronal Abeta accumulation precedes plaque formation in beta-amyloid precursor protein and presenilin-1 double-transgenic mice. *Neuroscience Letters*. 306: 116-120.
- Wirths O., Multhaup G., Bayer T. A. (2004): A modified beta-amyloid hypothesis: intraneuronal accumulation of the beta-amyloid peptide – the first Step of a fatal cascade. *Journal of Neurochemistry*. 91: 513-520.
- Wirths O., Breyhan H., Cynis H., Schilling S., Demuth H.-U., Bayer T. A. (2009): Intraneuronal pyroglutamate-Abeta 3-42 triggers neurodegeneration and lethal neurological deficits in a transgenic mouse model. *Acta Neuropathologica*. 118: 487-496.
- Wischik C. M., Bentham P., Wischik D. J., Seng K. M. (2008): Tau aggregation Inhibitors (TAI) therapy with Rember™ arrests disease progression in mild and moderate Alzheimer's Disease over 50 Weeks. *International Conference on Alzheimer's and Dementia*. Abstract O3-04-07.
- Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J. (1985): Improved M13 Phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*. 33: 103-119.
- Yatin S. M., Yatin M., Varadarajan S., Ain K. B., Butterfield D. A. (2001): Role of spermine in amyloid β -peptide-associated free radicals-induced neurotoxicity. *Journal of Neuroscience Research*. 63: 395-401.
- Young-Pearse T. L., Chen A. C., Chang R., Marquez C., Selkoe D. J. (2008): Secreted APP regulates the function of full-length APP in neurite outgrowth through interaction with integrin beta 1. *Neuronal Development*. 3: 1-15.
- Zannis V. I., Just P. W., Breslow J. L. (1981): Human apolipoprotein E isoprotein subclasses are genetically determined. *American Society of Human Genetics*. 33: 11-24.
- Zimmermann M., Gardoni F., Di Luca M. (2005): Molecular rationale for the pharmacological treatment of Alzheimer's disease. *Drugs Aging*. Suppl. 1: 27-37.

Sonstige Quellen

- AD & FTD Mutation Database. <http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations/> (20.12.2009).
- Banks' Florilegium - The Flowering of the Pacific. Bildtafel 656. veröffentlicht durch *Alecto Historical Editions in association with British Museum*. <http://yushodo.co.jp/kikou/banks/img/596.jpg> (16.01.2010).
- BLAST, *Basic Local Alignment Search Tool*. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (16.09.2009).
- ClinicalTrials.gov, a service of the U. S. National Institutes of Health. <http://clinicaltrials.gov> (19.01.2010).
- Royal Botanic Garden & Domain Trust, Sydney Australia. <http://planetnet.rbgsyd.nsw.gov.au> (16.01.2010).
- SOWN Inc., Australia. http://www.saveourwaterwaysnow.com.au/01_cms/details_pop.asp?ID=295 (16.01.2010).

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Modifizierte Amyloid-Kaskaden-Hypothese	6
Abbildung 2	Bildung von Pyro-Glutamat-A β -Peptid	7
Abbildung 3	Pharmakotherapie mit Antidementiva und Psychopharmaka	12
Abbildung 4	Neue Arzneistoffe zur Behandlung der Alzheimer-Demenz	18
Abbildung 5	Neue Medikationsstrategie zur Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen ...	19
Abbildung 6	Isoform-bestimmende Nukleotidsequenz des humanen <i>APOE</i> -Gens	20
Abbildung 7	Modell-Darstellung des humanen Apolipoproteins E und der ApoE4-Domänen- Interaktion	22
Abbildung 8	Übersicht über potentiell neurotoxische ApoE/ApoE4-Fragmente, die möglicherweise in neuropathologische Veränderungen involviert sind	24
Abbildung 9	Vereinfachte Modell-Darstellung des NMDA-Rezeptors	27
Abbildung 10	Bekannte NMDA-Antagonisten	28
Abbildung 11	Bekannte NMDA-Modulatoren	30
Abbildung 12	<i>Pipturus argenteus</i> WEDD. Familie Urticaceae	31
Abbildung 13	Anordnung der ITS-Region sowie der Bindungsstelle der verwendeten Primer	52
Abbildung 14	Pipettierschema für 96well-Mikrotiterplatte beim NMDA-Assay	59
Abbildung 15	Testprinzip des LDH-Assays	60
Abbildung 16	Nukleinsäuresequenz (Ausschnitt) von Plasmid pEGKApoE4C [25007]	69
Abbildung 17	SDS-PAGE – Vergleich der heterologen Expression des Fusionsproteins GST-ApoE in verschiedenen Expressionssystemen	70
Abbildung 18	SDS-PAGE – Vergleich zwischen löslicher und unlöslicher Zellfraktion verschiedener <i>E.-coli</i> -Expressionsklone nach Coomassiefärbung	71
Abbildung 19	Western-Blot-Nachweis des Fusionsproteins im Zellextrakt mit GST- und ApoE- Antikörpern	72
Abbildung 20	SDS-PAGE – Reinigung von rekombinatem GST-ApoE mit Hilfe der Affinitätschromato- graphie unter nativen Bedingungen (bakterielles Expressionssystem, pGEX-5T)	73
Abbildung 21	SDS-PAGE – Reinigung von rekombinatem GST-ApoE mit Hilfe der Affinitätschromato- graphie unter nativen Bedingungen (bakterielles Expressionssystem, pGEX-6-P1)	74
Abbildung 22	Western-Blot-Nachweis von rekombinatem ApoE nach Reinigung und Spaltung mit PreScission-Protease mit ApoE-Antikörpern	75
Abbildung 23	Western-Blot-Nachweis des Fusionsproteins nach Reinigung mit GST-Antikörpern	76
Abbildung 24	SDS-PAGE – Denaturierender Reinigungsversuch von aggregiertem ApoE	77
Abbildung 25	ApoE-Peptid-Toxizität nach 24 h	78
Abbildung 26	ApoE-Peptid-Toxizität im Vergleich	80
Abbildung 27	Western-Blot-Nachweis von NR1 in induzierten, nicht induzierten Klonen und in Wildtyp-Zellen mit monoklonalem Maus Antikörper anti-NR1	81
Abbildung 28	Schematischer Ablauf des NMDA-Assays	82
Abbildung 29	NMDAR-vermittelte Exzitotoxizität	84
Abbildung 30	Inhibitionskurven von Ketamin, Memantin und MK-801	86
Abbildung 31	Aktivität von Spermin und Spermidin am NMDAR	87
Abbildung 32	Grundstruktur der β -Carboline mit Nummerierung	88
Abbildung 33	Ergebnisse des Initialscreenings der β -Carbolin-Derivate am NMDAR (L12)	93
Abbildung 34	Ergebnisse des Initialscreenings bivalenter β -Carbolin-Derivate am NMDAR (L12)	94

Abbildung 35	Inhibitionskurven ausgewählter aktiver β -Carbolin-Derivate	95
Abbildung 36	Vergleich der inhibitorischen Aktivität am NMDAR an L12- und L13-Zellen ausgewählter β -Carbolin-Derivate	96
Abbildung 37	Inhibitorische Aktivität am NMDAR in Abhängigkeit von der Spacerlänge aktiver β -Carbolin-Derivate	97
Abbildung 38	Kompetitionsversuche mit Spermin	98
Abbildung 39	NR2B-spezifische Radioligandenverdrängung mit [3H]Ifenprodil mit verschiedenen Konzentrationen von 15d	99
Abbildung 40	Flurbiprofen und Flurbiprofen-Derivate 27a-27i	100
Abbildung 41	Hemmung der NMDAR-vermittelten Exzitotoxizität durch Flurbiprofen-Derivate	101
Abbildung 42	Strukturformeln getesteter Phencyclidin-Derivate	101
Abbildung 43	Hemmung der NMDAR-vermittelten Exzitotoxizität durch Phencyclidin-Derivate	103
Abbildung 44	Neuartige 3-Benzazepin-Derivate	103
Abbildung 45	Strukturformeln getesteter 3-Benzazepin-Derivate	104
Abbildung 46	Hemmung der NMDAR-vermittelten Exzitotoxizität durch 3-Benzazepin-Derivate	105
Abbildung 47	Strukturformeln aktiver Verbindungen (Tacin, Verbindung 28c und 36)	106
Abbildung 48	Ergebnisse des Screenings weiterer Reinsubstanzen am NMDAR (L12)	108
Abbildung 49	Ergebnisse des Initialscreenings der TCM-Pflanzenextrakte am NMDAR (L12)	111
Abbildung 50	Dünnschichtchromatogramme der Wasser- und Methanol-Extrakte von <i>Cynomorium songaricum</i> (Kieselgel 60, F ₂₅₄ , FM1)	112
Abbildung 51	Ergebnisse des Screenings ausgewählter Extrakte der Vanuatu-Wildsammlung	115
Abbildung 52	Schema zur Herstellung der Primärextrakte mit Angabe der Ausbeute der Trockenextrakte	116
Abbildung 53	Isolierungsschema der aktivitätsgeleiteten Fraktionierung des methanolischen <i>Pipturus</i> -Extraktes A3	118
Abbildung 54	Inhibitorische Aktivität am NMDA-Rezeptor (L12-Zellen)	119
Abbildung 55	Dünnschichtchromatogramme der Fraktionen C2 (Spur 1), C3 (Spur 2) und C4 (Spur 3) (Kieselgel 60, F ₂₅₄ , FM1)	120
Abbildung 56	Sequenzvergleich der ITS-Regionen mit BLAST (16.09.2009)	122
Abbildung 57	Mögliche Multi-Target-Therapie bivalenter β -Carboline zur Behandlung der Alzheimerschen Krankheit	137
Abbildung 58	Verbindung 1 bis 6a	168
Abbildung 59	Verbindung 6b bis 9	169
Abbildung 60	Verbindung 9a bis 13	170
Abbildung 61	Verbindung 14 bis 15i	171
Abbildung 62	Verbindung 15j bis 22a	172
Abbildung 63	Verbindung 23 bis 27a	173
Abbildung 64	Verbindung 27b bis 28	174
Abbildung 65	Verbindung 28a bis 32	175
Abbildung 66	Verbindung 33 bis 36a	176
Abbildung 67	Verbindung 36b bis 45	177
Abbildung 68	Verbindung 46 bis 48	178
Abbildung 69	Verwendete Expressionsvektoren	179

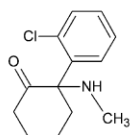
10. Anhang

Tabelle 7 | Kontrollexperiment zum Ausschluss inhibierender Effekte von NMDAR-Antagonisten bzw. aktiven Extrakten an der durch Zelllyse freigesetzten Lactatdehydrogenase (LDH)

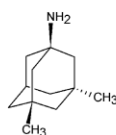
L12-Zellen wurden in Abwesenheit der Agonisten L-Glutamat und Glycin mit aktiven Substanzen bzw. Extrakten behandelt (siehe Material und Methoden Kapitel 3.2.4.1.) und anschließend mit Triton® X-100 lysiert. Die durch Zelllyse freigesetzte LDH wurde als Absorption bei 492 nm gemessen. Die Berechnung erfolgte als Verhältnis (%) zwischen mit und ohne Substanz bzw. Extrakt.

Substanz/Extrakt	Konzentration	LDH-Aktivität [%] \pm SD im Vergleich zur Kontrolle ohne Substanz
1 (Ketamin)	100 μ M	104,9 \pm 9,7
2 (Memantin)	100 μ M	96,1 \pm 0,8
15d	100 μ M	99,4 \pm 9,6
15f	100 μ M	107,4 \pm 0,1
24a	100 μ M	104,8 \pm 4,2
24b	100 μ M	104,7 \pm 14,4
28 (Tacrin)	100 μ M	116,5 \pm 1,8
5a	100 μ M	98,6 \pm 6,6
26	10 μ M	102,4 \pm 6,5
26a	10 μ M	96,4 \pm 11,2
26b	10 μ M	94,8 \pm 8,3
<i>C. songaricum</i> (H ₂ O-Extrakt)	50 μ g/ml	100,7 \pm 1,1
<i>C. songaricum</i> (MeOH-Extrakt)	50 μ g/ml	102,2 \pm 4,3
<i>D. vitiense</i> (MeOH-Extrakt)	50 μ g/ml	104,3 \pm 0,8
C4	50 μ g/ml	109,0 \pm 6,9
<i>P. argenteus</i> (MeOH-Extrakt)	50 μ g/ml	99,8 \pm 1,5

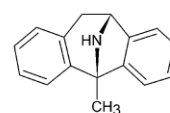
Strukturformeln



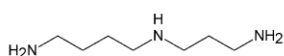
1
Ketamin
 $C_{13}H_{16}ClNO$
 $M = 237,74 \text{ g/mol}$



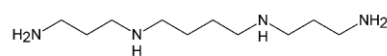
2
Memantin
 $C_{21}H_{21}N$
 $M = 179,31 \text{ g/mol}$



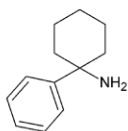
3
(+)-MK-801
 $C_{16}H_{15}N$
 $M = 221,30 \text{ g/mol}$



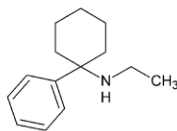
4a
Spermidin
 $C_7H_{19}N_3$
 $M = 145,25 \text{ g/mol}$



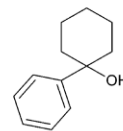
4b
Spermin
 $C_{10}H_{26}N_4$
 $M = 202,34 \text{ g/mol}$



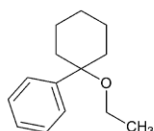
5
1-Phenylcyclohexylamin (PCA)
 $C_{12}H_{17}N$
 $M = 175,27 \text{ g/mol}$



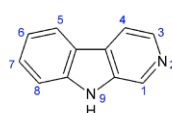
5a
N-Ethyl-1-phenylcyclohexanamin (PCE)
 $C_{14}H_{21}N$
 $M = 203,32 \text{ g/mol}$



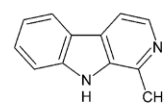
5b
1-Phenylcyclohexanol (PCOH)
 $C_{12}H_{16}O$
 $M = 176,26 \text{ g/mol}$



5c
(1-Ethoxycyclohexyl)benzen (PCOE)
 $C_{14}H_{20}O$
 $M = 204,31 \text{ g/mol}$

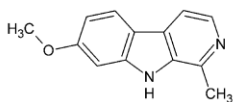


6
Norharman (β -Carbolin)
 $C_{11}H_8N_2$
 $M = 168,20 \text{ g/mol}$

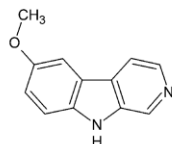


6a
Harman
 $C_{12}H_{10}N_2$
 $M = 182,22 \text{ g/mol}$

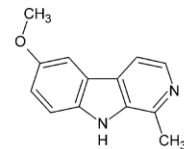
Abbildung 58 | Verbindung 1 bis 6a



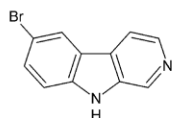
6b
Harmin
 $C_{13}H_{12}N_2O$
 $M = 212,25 \text{ g/mol}$



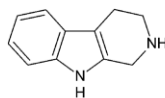
6c
6-Methoxy-β-carboline
 $C_{12}H_{10}N_2O$
 $M = 198,22 \text{ g/mol}$



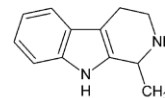
6d
6-Methoxy-1-methyl-β-carboline
 $C_{13}H_{12}N_2O$
 $M = 212,25 \text{ g/mol}$



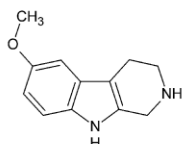
6e
6-Bromo-β-carboline
 $C_{11}H_7BrN_2$
 $M = 172,23 \text{ g/mol}$



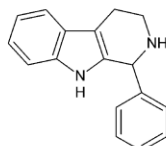
7
1,2,3,4-Tetrahydro-β-carboline
 $C_{11}H_{12}N_2$
 $M = 172,23 \text{ g/mol}$



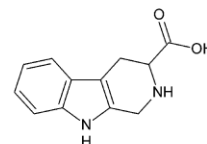
7a
rac-1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro-β-carboline
 $C_{12}H_{14}N_2$
 $M = 186,25 \text{ g/mol}$



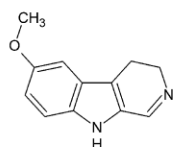
7b
6-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydro-β-carboline
 $C_{12}H_{14}N_2O$
 $M = 202,25 \text{ g/mol}$



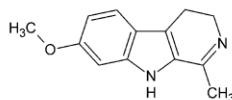
7c
1-Phenyl-1,2,3,4-tetrahydro-β-carboline
 $C_{17}H_{16}N_2$
 $M = 248,32 \text{ g/mol}$



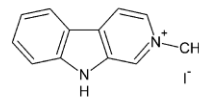
7d
1,2,3,4-Tetrahydro-β-carboline-3-carboxylic acid
 $C_{12}H_{12}N_2O_2$
 $M = 216,24 \text{ g/mol}$



8
6-Methoxy-3,4-dihydro-β-carboline
 $C_{13}H_{12}N_2O$
 $M = 200,24 \text{ g/mol}$

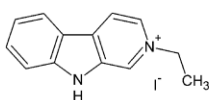


8a
Harmalin
 $C_{13}H_{14}N_2O$
 $M = 214,26 \text{ g/mol}$

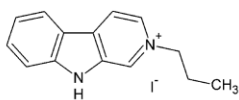


9
2-Methyl-β-carboline-2-iumiodide
 $C_{12}H_{11}IN_2$
 $M = 310,14 \text{ g/mol}$

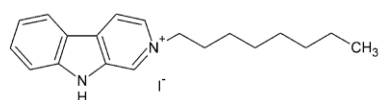
Abbildung 59 | Verbindung 6b bis 9



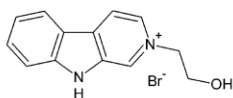
9a
2-Ethyl-β-carbolin-2-iumiodid
 $C_{13}H_{13}IN_2$
 $M = 324,16 \text{ g/mol}$



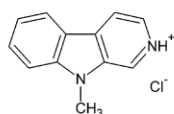
9b
2-Propyl-β-carbolin-2-iumiodid
 $C_{14}H_{15}IN_2$
 $M = 338,19 \text{ g/mol}$



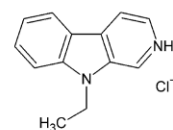
9c
2-Octyl-β-carbolin-2-iumiodid
 $C_{19}H_{25}IN_2$
 $M = 408,32 \text{ g/mol}$



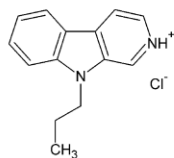
9d
2-(2-Hydroxyethyl)-β-carbolin-2-iumbromid
 $C_{13}H_{13}BrN_2O$
 $M = 293,16 \text{ g/mol}$



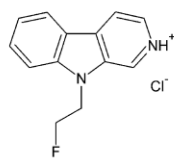
10
9-Methyl-β-carbolin-2-iumchlorid
 $C_{12}H_{11}ClN_2$
 $M = 218,68 \text{ g/mol}$



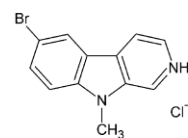
10a
9-Ethyl-β-carbolin-2-iumchlorid
 $C_{13}H_{13}ClN_2$
 $M = 232,71 \text{ g/mol}$



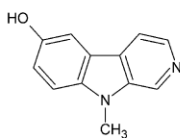
10b
9-Propyl-β-carbolin-2-iumchlorid
 $C_{14}H_{15}ClN_2$
 $M = 246,74 \text{ g/mol}$



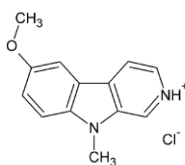
10c
9-(2-Fluoroethyl)-β-carbolin-2-iumchlorid
 $C_{13}H_{12}ClFN_2$
 $M = 250,70 \text{ g/mol}$



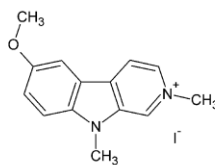
10d
6-Bromo-9-methyl-β-carbolin-2-iumchlorid
 $C_{12}H_{10}BrClN_2$
 $M = 297,58 \text{ g/mol}$



11
9-Methyl-β-carbolin-6-ol
 $C_{12}H_{10}N_2O$
 $M = 198,22 \text{ g/mol}$

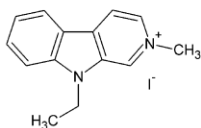


12
6-Methoxy-9-methyl-β-carbolin-2-iumchlorid
 $C_{13}H_{13}ClN_2O$
 $M = 248,70 \text{ g/mol}$

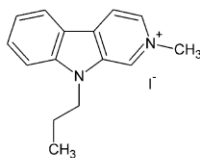


13
6-Methoxy-2,9-dimethyl-β-carbolin-2-iumiodid
 $C_{14}H_{15}IN_2O$
 $M = 354,18 \text{ g/mol}$

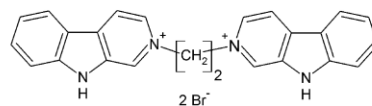
Abbildung 60 | Verbindung 9a bis 13



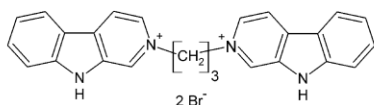
14
9-Ethyl-2-methyl-β-carbolin-2-iumiodid
 $C_{14}H_{15}IN_2$
 $M = 338,19 \text{ g/mol}$



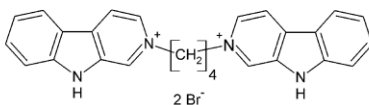
14a
2-Methyl-9-propyl-β-carbolin-2-iumiodid
 $C_{15}H_{17}N_2$
 $M = 352,21 \text{ g/mol}$



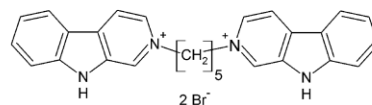
15
2-[2-(β-Carbolin-2-ium-2-yl)ethyl]-
β-carbolin-2-iumdibromid
 $C_{24}H_{20}Br_2N_4$
 $M = 524,26 \text{ g/mol}$



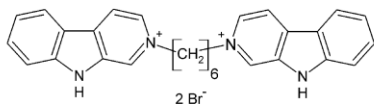
15a
2-[3-(β-Carbolin-2-ium-2-yl)propyl]-
β-carbolin-2-iumdibromid
 $C_{25}H_{22}Br_2N_4$
 $M = 538,28 \text{ g/mol}$



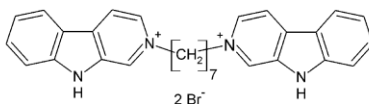
15b
2-[4-(β-Carbolin-2-ium-2-yl)butyl]-
β-carbolin-2-iumdibromid
 $C_{26}H_{24}Br_2N_4$
 $M = 552,31 \text{ g/mol}$



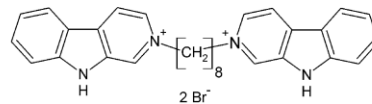
15c
2-[5-(β-Carbolin-2-ium-2-yl)pentyl]-
β-carbolin-2-iumdibromid
 $C_{27}H_{26}Br_2N_4$
 $M = 566,34 \text{ g/mol}$



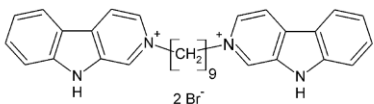
15d
2-[6-(β-Carbolin-2-ium-2-yl)hexyl]-
β-carbolin-2-iumdibromid
 $C_{28}H_{28}Br_2N_4$
 $M = 580,37 \text{ g/mol}$



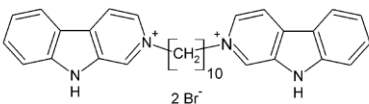
15e
2-[7-(β-Carbolin-2-ium-2-yl)heptyl]-
β-carbolin-2-iumdibromid
 $C_{29}H_{30}Br_2N_4$
 $M = 594,38 \text{ g/mol}$



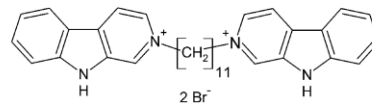
15f
2-[8-(β-Carbolin-2-ium-2-yl)octyl]-
β-carbolin-2-iumdibromid
 $C_{30}H_{32}Br_2N_4$
 $M = 608,41 \text{ g/mol}$



15g
2-[9-(β-Carbolin-2-ium-2-yl)nonyl]-
β-carbolin-2-iumdibromid
 $C_{31}H_{34}Br_2N_4$
 $M = 622,44 \text{ g/mol}$

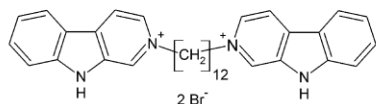


15h
2-[10-(β-Carbolin-2-ium-2-yl)decyl]-
β-carbolin-2-iumdibromid
 $C_{32}H_{36}Br_2N_4$
 $M = 636,46 \text{ g/mol}$

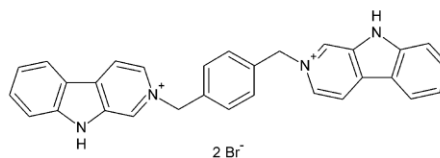


15i
2-[11-(β-Carbolin-2-ium-2-yl)undecyl]-
β-carbolin-2-iumdibromid
 $C_{33}H_{38}Br_2N_4$
 $M = 650,49 \text{ g/mol}$

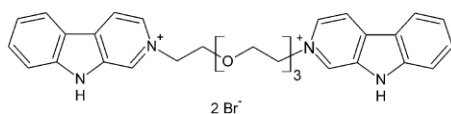
Abbildung 61 | Verbindung 14 bis 15i



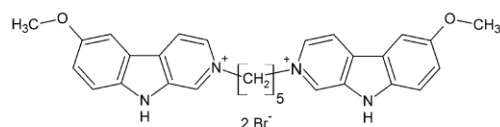
15j
2-[12-(β-Carbolin-2-ium-2-yl)dodecyl]-
β-carbolin-2-iumdibromid
 $C_{34}H_{40}Br_2N_4$
 $M = 664,52 \text{ g/mol}$



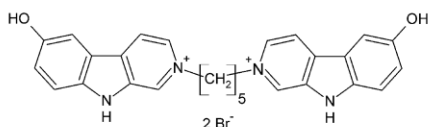
16
2-[4-(β-Carbolin-2-ium-2-ylmethyl)benzyl]-
β-carbolin-2-iumdibromid
 $C_{30}H_{24}Br_2N_4$
 $M = 600,35 \text{ g/mol}$



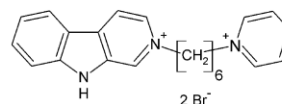
17
2-[2-(2-[2-(β-Carbolin-2-ium-2-yl)ethoxy]ethoxy)ethyl]-
β-carbolin-2-iumdibromid
 $C_{30}H_{32}Br_2N_4O_3$
 $M = 656,41 \text{ g/mol}$



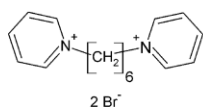
18
6-Methoxy-2-[5-(6-methoxy-β-carbolin-2-ium-2-yl)pentyl]-
β-carbolin-2-iumdibromid
 $C_{25}H_{30}Br_2N_4O_2$
 $M = 626,38 \text{ g/mol}$



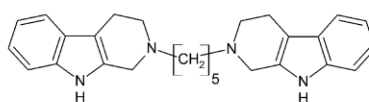
19
6-Hydroxy-2-[5-(6-hydroxy-β-carbolin-2-ium-2-yl)pentyl]-
β-carbolin-2-iumdibromid
 $C_{27}H_{26}Br_2N_4O_2$
 $M = 598,33 \text{ g/mol}$



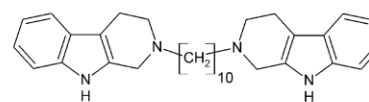
20
2-(6-Pyridinium-1-yl-hexyl)-β-carbolin-
2-iumdibromid
 $C_{22}H_{23}Br_2N_3$
 $M = 491,26 \text{ g/mol}$



21
1-(6-Pyridinium-1-yl-hexyl)-
pyridiniumdibromid
 $C_{18}H_{22}Br_2N_2$
 $M = 402,17 \text{ g/mol}$

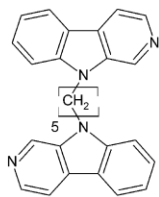


22
2-[5-(1,2,3,4-Tetrahydro-β-carbolin-2-yl)pentyl]-1,2,3,4-tetrahydro-β-carbolin-
2-iumdibromid
 $C_{27}H_{32}N_4$
 $M = 412,57 \text{ g/mol}$

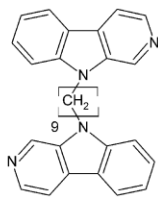


22a
2-[10-(1,2,3,4-Tetrahydro-β-carbolin-2-yl)decyl]-1,2,3,4-tetrahydro-β-carbolin-
2-iumdibromid
 $C_{32}H_{42}N_4$
 $M = 482,70 \text{ g/mol}$

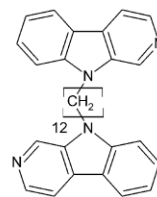
Abbildung 62 | Verbindung 15j bis 22a



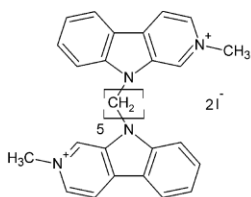
23
9[5-(β-Carbolin-9-yl)pentyl]-β-carbolin
 $C_{27}H_{32}N_4$
 $M = 404,51 \text{ g/mol}$



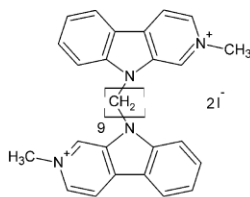
23a
9[9-(β-Carbolin-9-yl)nonyl]-β-carbolin
 $C_{37}H_{48}N_4$
 $M = 460,62 \text{ g/mol}$



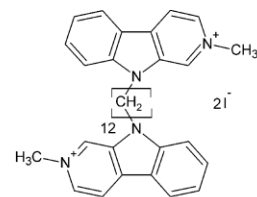
23b
9[12-(β-Carbolin-9-yl)dodecyl]-β-carbolin
 $C_{34}H_{48}N_4$
 $M = 502,69 \text{ g/mol}$



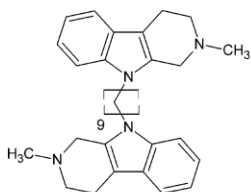
24
2-Methyl-9-[5-(2-methyl-β-carbolin-9-yl)pentyl]-β-carbolin-2-iumdiiodid
 $C_{29}H_{30}I_2N_4$
 $M = 688,38 \text{ g/mol}$



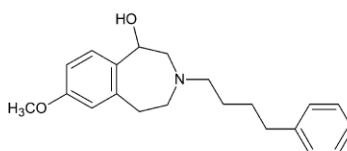
24a
2-Methyl-9-[9-(2-methyl-β-carbolin-9-yl)nonyl]-β-carbolin-2-iumdiiodid
 $C_{39}H_{38}I_2N_4$
 $M = 744,49 \text{ g/mol}$



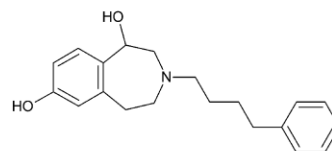
24b
2-Methyl-9-[12-(2-methyl-β-carbolin-9-yl)dodecyl]-β-carbolin-2-iumdiiodid
 $C_{36}H_{44}I_2N_4$
 $M = 786,57 \text{ g/mol}$



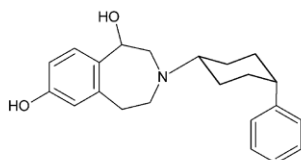
25
2-Methyl-9-[9-(2-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-β-carbolin-9-yl)nonyl]-1,2,3,4-β-carbolin
 $C_{33}H_{44}N_4$
 $M = 496,73 \text{ g/mol}$



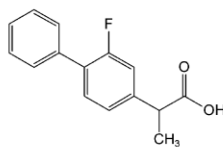
26
7-Methoxy-3-(4-phenylbutyl)-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepin-1-ol
 $C_{21}H_{27}NO_2$
 $M = 325,44 \text{ g/mol}$



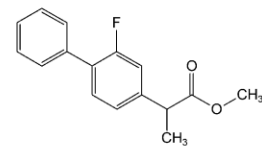
26a
3-(4-Phenylbutyl)-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepin-1,7-diol
 $C_{20}H_{25}NO_2$
 $M = 311,42 \text{ g/mol}$



26b
cis-3-(4-Phenylcyclohexyl)-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepin-1,7-diol
 $C_{22}H_{27}NO_2$
 $M = 337,46 \text{ g/mol}$

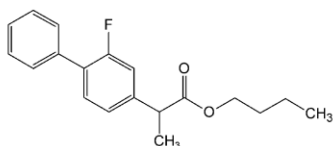


27
Flurbiprofen
 $C_{15}H_{13}FO_2$
 $M = 244,27 \text{ g/mol}$

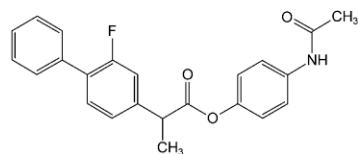


27a
Methyl-(2S)-2-(2-fluoro-1,1'-biphenyl)propanoat
 $C_{16}H_{15}FO_2$
 $M = 258,29 \text{ g/mol}$

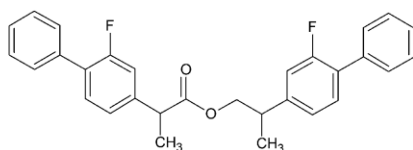
Abbildung 63 | Verbindung 23 bis 27a



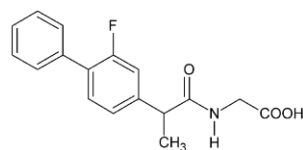
27b
Butyl-(2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoat
 $C_{19}H_{21}FO_4$
M = 300,37 g/mol



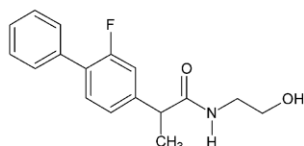
27c
(4-Acetamidophenyl)-(2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoat
 $C_{23}H_{20}FNO_3$
M = 377,41 g/mol



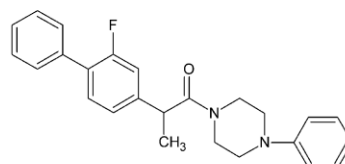
27d
(2S)-2-(2-Fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propyl-(2S)-2-(fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoat
 $C_{30}H_{26}F_2O_2$
M = 456,53 g/mol



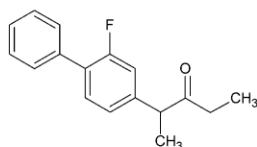
27e
N-[(2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoyl]glycin
 $C_{17}H_{16}FNO_3$
M = 301,32 g/mol



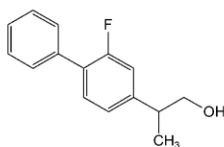
27f
(2S)-2-(2-Fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)-N-(2hydroxyethyl)propanamid
 $C_{17}H_{18}FNO_2$
M = 287,33 g/mol



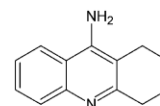
27g
1-[(2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoyl]-4-phenylpiperazin
 $C_{25}H_{25}FN_2O$
M = 388,48 g/mol



27h
(2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)pentan-3-on
 $C_{17}H_{17}FO$
M = 256,32 g/mol

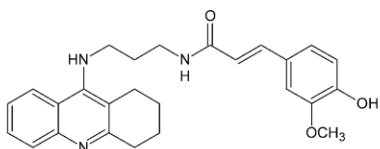


27i
(2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propan-1-ol
 $C_{15}H_{15}FO$
M = 230,28 g/mol

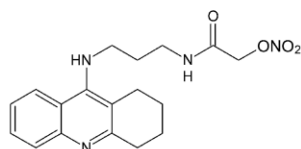


28
Tacrin
 $C_{13}H_{14}N_2$
M = 198,26 g/mol

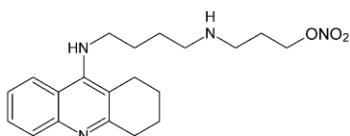
Abbildung 64 | Verbindung 27b bis 28

**28a**

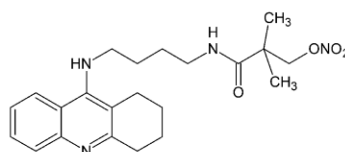
(E)-3-(4-Hydroxy-3-methoxy-phenyl)-N-[3-(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-ylamino)propyl]prop-2-enamid
 $C_{26}H_{28}N_2O_3$
 $M = 431,53 \text{ g/mol}$

**28b**

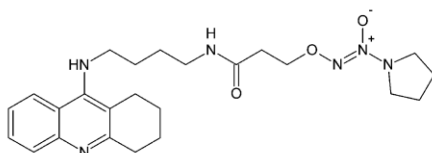
[2-Oxo-2-[3-(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-ylamino)propylamino]ethyl]nitrat
 $C_{18}H_{22}N_4O_4$
 $M = 358,39 \text{ g/mol}$

**28c**

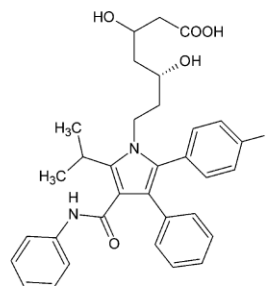
3-[4-(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-ylamino)butylamino]propyl nitrat
 $C_{20}H_{28}N_4O_3$
 $M = 372,46 \text{ g/mol}$

**28d**

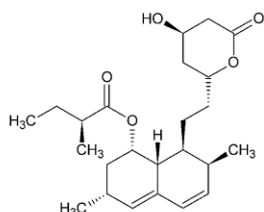
[2,2-Dimethyl-3-oxo-3-[4-(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-ylamino)butylamino]propyl]nitrat
 $C_{22}H_{30}N_4O_4$
 $M = 414,50 \text{ g/mol}$

**28e**

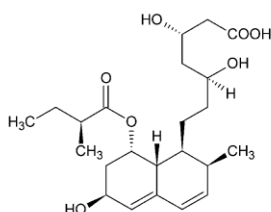
(Z)-oxido[3-oxo-3-[4-(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-ylamino)butylamino]propoxy]imino-pyrrolidin-1-yl-ammonium
 $C_{24}H_{34}N_6O_3$
 $M = 454,57 \text{ g/mol}$

**29**

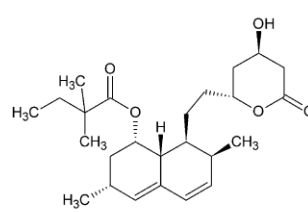
Atorvastatin
 $C_{33}H_{35}FN_2O_5$
 $M = 558,64 \text{ g/mol}$

**30**

Lovastatin
 $C_{24}H_{36}O_5$
 $M = 404,54 \text{ g/mol}$

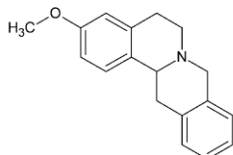
**31**

Pravastatin
 $C_{23}H_{36}O_7$
 $M = 424,53 \text{ g/mol}$

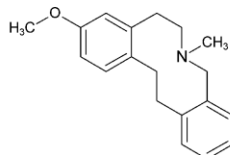
**32**

Simvastatin
 $C_{25}H_{38}O_5$
 $M = 418,57 \text{ g/mol}$

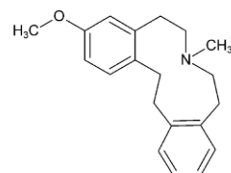
Abbildung 65 | Verbindung 28a bis 32



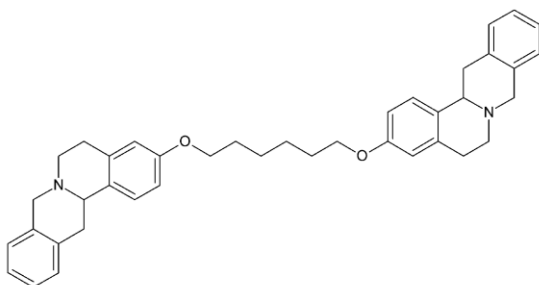
33
3-Methoxy-6,8,13,13a-tetrahydro-5H-
isochinolino[3,2-a]isochinolin
 $C_{18}H_{19}NO$
 $M = 265,35 \text{ g/mol}$



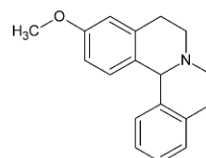
33a
10-Methoxy-6-methyl-5,6,7,8,13,14-
hexahydrodibenzo[c,g]azecin
 $C_{19}H_{23}NO$
 $M = 281,39 \text{ g/mol}$



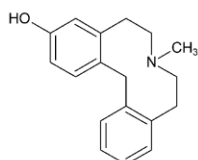
33b
3-Methoxy-7-methyl-6,7,8,9,14,15-
hexahydro-5H-dibenzo[d,h]azacycloundecin
 $C_{20}H_{25}NO$
 $M = 295,42 \text{ g/mol}$



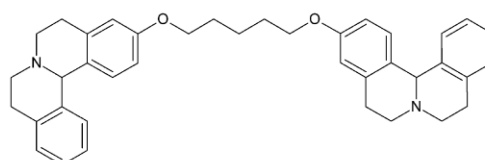
33c
3-[6-(6,8,13,13a-Tetrahydro-5H-isochinolino[3,2-a]isochinolin-3-
yloxy)hexoxy]-6,8,13,13a-tetrahydro-5H-isochinolino
[3,2-a]isochinolin
 $C_{40}H_{44}N_2O_2$
 $M = 584,79 \text{ g/mol}$



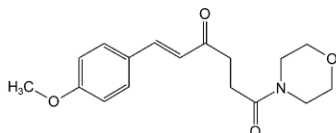
34
11-Methoxy-6,8,9,13b-tetrahydro-5H-isochinolino[1,2-a]isochinolin
 $C_{18}H_{19}NO$
 $M = 265,35 \text{ g/mol}$



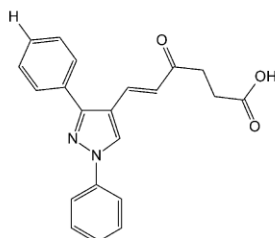
34a
3-Methyl-5,6,7,8,9,14-hexahydrodibenzo[d,g]azecin-3-ol
 $C_{18}H_{21}NO$
 $M = 267,37 \text{ g/mol}$



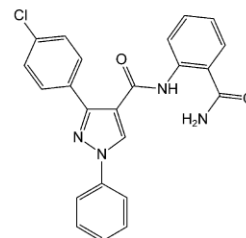
34b
11-[5-(6,8,9,13b-Tetrahydro-5H-isochinolino[1,2-a]isochinolin-11-
yloxy)pentoxy]-6,8,9,13b-tetrahydro-5H-isochinolino[1,2-a]isochinolin
 $C_{38}H_{42}N_2O_2$
 $M = 570,76 \text{ g/mol}$



35
(E)-6-(4-Methoxyphenyl)-1-morpholino-
hex-5-en-1,4-dion
 $C_{17}H_{21}NO_4$
 $M = 303,35 \text{ g/mol}$

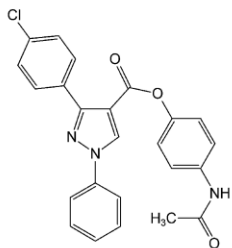


36
(E)-6-(1,3-Diphenylpyrazol-4-yl)-4-oxo-hex-
5-ensäure
 $C_{23}H_{18}N_2O_3$
 $M = 346,38 \text{ g/mol}$

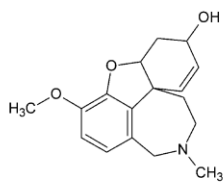


36a
N-(2-Carbamoylphenyl)-3-(4-chlorophenyl)-1-
phenyl-pyrazol-4-carboxamid
 $C_{23}H_{17}ClN_3O_2$
MW: 416,86 g/mol

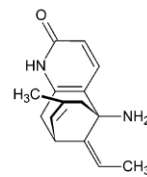
Abbildung 66 | Verbindung 33 bis 36a



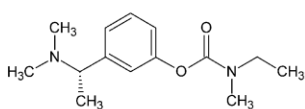
36b
(4-Acetamidophenyl)-3-(4-chlorophenyl)-1-phenyl-pyrazol-4-carboxylat
 $C_{24}H_{18}ClN_3O_3$
 $M = 431,87 \text{ g/mol}$



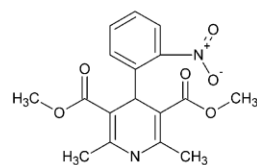
37
Galantamin
 $C_{17}H_{21}NO_3$
 $M = 287,4 \text{ g/mol}$



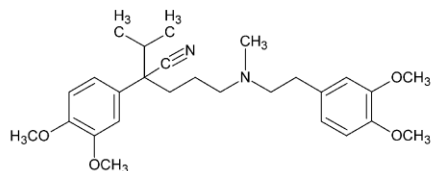
38
Huperzin A
 $C_{15}H_{20}N_2O$
 $M = 244,33 \text{ g/mol}$



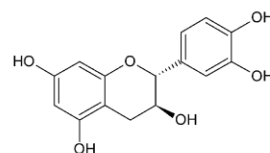
39
Rivastigmin
 $C_{14}H_{23}N_2O_2$
 $M = 250,3 \text{ g/mol}$



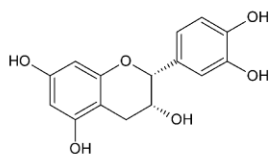
40
Nifedipin
 $C_{17}H_{18}N_2O$
 $M = 346,34 \text{ g/mol}$



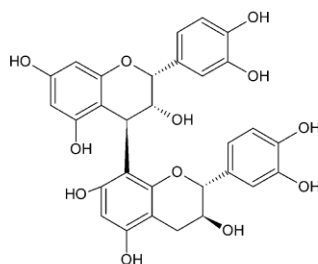
41
Verapamil
 $C_{27}H_{35}ClN_2O_4$
 $M = 491,1 \text{ g/mol}$



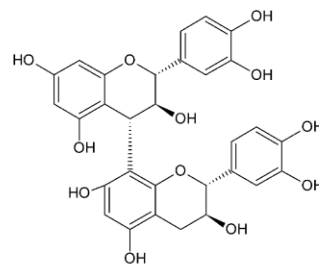
42
(+)-Catechin
 $C_{15}H_{14}O_6$
 $M = 290,27 \text{ g/mol}$



43
(-)-Epicatechin
 $C_{15}H_{14}O_6$
 $M = 290,27 \text{ g/mol}$

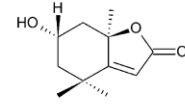


44
Procyanidin B-1
 $C_{30}H_{26}O_{12}$
 $M = 578,52 \text{ g/mol}$



45
Procyanidin B-3
 $C_{30}H_{26}O_{12}$
 $M = 578,52 \text{ g/mol}$

Abbildung 67 | Verbindung 36b bis 45



48
Loliolid
 $C_{11}H_{16}O_3$
 $M = 196,24 \text{ g/mol}$

Vektorkarten



Liste der wissenschaftlichen Publikationen

Boywitz, K.*, K.-U. Schmidtke*, G. Bradacs, J. Heilmann, T. Winckler (2009): Screening of Medicinal Plants from Vanuatu for neuroprotective properties. Posterpräsentation, DPhG-Jahrestagung, Jena (Deutschland). (*contributed equally to this work)

Rook, Y., K.-U. Schmidtke, J. Heilmann, J. Lehmann, T. Winckler (2009): Multi-target-directed β -carbolines as anti-alzheimer drug candidates. Posterpräsentation, DPhG-Jahrestagung, Jena (Deutschland).

Veröffentlichungen:

Tewes B., B. Frehland, D. Schepmann, K.-U. Schmidtke, T. Winckler, B. Wünsch (2010): Design, Synthesis, and Biological Evaluation of 3-Benzazepin-1-ols as NR2B-Selective NMDA Receptor Antagonists. *ChemMedChem*. 5 (5): 687-695.

Rook Y., K.-U. Schmidtke, F. Gaube, D. Schepmann, B. Wünsch, J. Heilmann, J. Lehmann, T. Winckler (2010): Bivalent β -Carbolines as Potential Multitarget Anti-Alzheimer Agents. *Journal of Medicinal Chemistry*. 53 (9): 3611-3617.

Tewes B., B. Frehland, D. Schepmann, K.-U. Schmidtke, T. Winckler, B. Wünsch (2010): Conformationally constrained NR2B selective NMDA receptor antagonists derived from ifenprodil: Synthesis and biological evaluation of tetrahydro-3-benzazepine-1,7-diols. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 18 (22): 8005-8015.

Ehrenwörtliche Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazie der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät an der Friedrich-Schiller-Universität Jena unter Anleitung von Prof. Dr. Thomas Winckler angefertigt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe, wobei mir die in der Danksagung erwähnten Personen unterstützend geholfen haben. Mir ist die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt. Weiterhin versichere ich, dass diese Arbeit noch an keiner anderen Hochschule als Dissertation oder Prüfungsleistung vorgelegt wurde. Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde von mir nicht in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit der vorgelegten Dissertation stehen.

Jena, 26. August 20120

Kai-Uwe Schmidtke

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen Januar 2005 und September 2009 am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Institut für Pharmazie der Friedrich-Schiller-Universität Jena unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Thomas Winckler angefertigt. An dieser Stelle möchte ich mich bei ihm für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die fachliche und zeitintensive Betreuung, die stetige Bereitschaft alle Fragen adäquat zu beantworten und das Einbringen von konstruktiven Ideen dieser Doktorarbeit bedanken.

Für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie zahlreiche Hilfestellungen und Ideen zu praktischen und theoretischen Aspekten der Arbeit, auch im Rahmen meines halbjährigen Forschungsaufenthaltes an der Universität Regensburg am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Jörg Heilmann bedanken.

Für die tatkräftige Unterstützung und für hilfreiche Ratschläge sowie für viele anregende Diskussionen möchte ich mich ganz besonders bei Frau Dr. Ulrike Werner und Herrn Dr. Friedemann Gaube bedanken. Ihre wegweisenden und kreativen Ideen in vielen Bereichen haben wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Mein Dank gilt auch den Kooperationspartnern Herrn Prof. Dr. Jochen Lehmann, Frau Dr. Yvonne Rook, Herrn Robert Otto und Herrn Dr. Christoph Enzensperger des Lehrstuhls für Pharmazeutische Chemie, Friedrich-Schiller-Universität Jena für die Bereitstellung von Reinsubstanzen und ihren fachlichen Hinweisen. Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Bernhard Wunsch, Dr. Bastian Tewes und Herrn Dr. Dirk Schepmann des Lehrstuhls für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Universität Münster für die Durchführung der Rezeptor-Bindungsstudien und für die Bereitstellung von Reinsubstanzen bedanken.

Außerdem möchte mich ganz herzlich bei meiner Arbeits- und Bürokollegin Katrin Boywitz bedanken, die mit mir nicht nur das Labor sondern auch das Büro geteilt hat. Gemeinsam haben wir gute aber auch schwierige Zeiten durchlebt, über die Jahre hinweg wurde Katrin für mich zu einer guten Freundin.

Dr. Sebastian Miethbauer danke ich für seine offene Art, seine stetige Diskussionsbereitschaft und seine freundschaftliche, langjährige Zusammenarbeit. Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Kollegin Frau Heidemarie Graf. Jederzeit gewährte sie mir bei der Planung, Vorbereitung und Durchführung meiner Experimente sachkundige und

wertvolle Unterstützung. Ebenso möchte ich mich bei meinen Kollegen Dr. Barbara Schubert, Sven Adler, Annika Bilzer, Heike Dölz, Dr. Jörg Lucas, Jana Schiefner, Michael Kaufmann, Dr. Oliver Siol, Uwe Beck und Angela Reimann für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Experimente, für logistische Leistungen und für die Zusammenarbeit in den verschiedenen Studentenpraktika sowie für das angenehme Arbeitsklima bedanken.

Bei den Kollegen aus Regensburg bedanke ich mich für ihre freundliche und geduldige Art mich bereitwillig in ihre Arbeitsgruppe aufgenommen zu haben. Die gesamte Arbeitsgruppe gab mir wertvolle inhaltliche Anmerkung bei der Planung und Durchführung meiner Experimente, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Besonders möchte ich mich bei Susann Haase, Anne Freischmidt und Rosmarie Scherübl bedanken, mit denen ich neben der Arbeit viele schöne Momente in Regensburg erlebt habe.

Ein Dankeschön möchte ich den Wahlpflicht-Studenten Melanie Kern, Rebecca Bauer, Dirke Haase, Isabell Göppel, Kerstin Heyder, Katja Eckert, Karoline Krompke, Sophie Krauel, Matthias Feist und Christina Dölz für ihr Mitwirken an verschiedenen Teilprojekten sagen.

Besonderer Dank gilt nicht zuletzt meiner Familie, meinen Freunden und meinem Partner Raffael, die mir stets Stabilität, Unterstützung und Harmonie im privaten Umfeld gaben. Diese Arbeit wäre ohne ihre Hilfe nicht möglich gewesen.